

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA, GEOLOGÍA Y GEOQUÍMICA



VALORACIÓN DE HARINAS FUNCIONALES DE
LEGUMINOSAS OBTENIDAS MEDIANTE OPTIMIZACIÓN
DE PROCESOS ENZIMÁTICOS Y FERMENTATIVOS



Reg. F.C. 35118

ROSA DOBLADO ORTAS
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)
Madrid, 2004

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
MADRID
BIBLIOTECA
CIENCIAS

Q 646487

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA, GEOLOGÍA Y GEOQUÍMICA

**VALORACIÓN DE HARINAS FUNCIONALES DE
LEGUMINOSAS OBTENIDAS MEDIANTE
OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS ENZIMÁTICOS Y
FERMENTATIVOS**

Memoria presentada por:

Rosa Doblado Ortas

Para optar al grado de Doctor en Ciencias

Sección Químicas

Directoras: *Dra. Concepción Vidal Casero y Dra. Juana Frías Arevalillo*

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)

Madrid, 2004

El presente trabajo está incluido en los Proyectos de Investigación financiados por la CICYT:

ALI 97-0636: "Transformación y mejora del valor nutritivo de leguminosas mediante adición de enzimas".

AGL 2000-1609-C02-01: "Optimización de procesos de fermentación para la obtención de nuevos alimentos funcionales de leguminosas. Valoración química".

AGL 2002-02905 ALI: "Procesos biotecnológicos para incrementar la capacidad antioxidante de leguminosas".

AGRADECIMIENTOS

Es difícil resumir en pocas líneas mi agradecimiento a aquellas personas que durante estos años de trabajo han contribuido en mayor o menor medida a la elaboración de esta Tesis. Sin ellas, nada de lo que a continuación se resume hubiera sido posible, por ello, no quiero olvidar:

A las Dras. Concepción Vidal y Juana Frías, directoras de este trabajo, por las oportunidades que me han concedido, así como por su confianza, ayuda y dedicación. Gracias.

A las entidades que han financiado este trabajo, sin las cuales hubiera sido difícil el desarrollo de esta memoria.

A la Dra. M^a Ángeles Martín-Cabrejas, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid, por su amabilidad durante estos años y por haber aceptado ser tutor de esta Tesis.

Al Dr. Serafin Valverde del Instituto de Química Orgánica, "Alma Mater" del capítulo de RMN, por su ayuda, amabilidad y sabios consejos. Así como a la Dra. M^a Luisa Jimeno por su inestimable ayuda en el análisis de las muestras por RMN.

A la Dra. Rosario Muñoz, Científico Titular del IFI, por su valiosa aportación a la preparación de muestras fermentadas y análisis microbiológicos.

Al Dr. Slawomir Frejnajel, por su ayuda en el manejo del fermentador y por 2 años de amistad y compañía. "Dobre Viechu".

Al Instituto de Fermentaciones Industriales por haberme acogido como becario y por las facilidades mostradas en todo momento. Gracias a todo su personal, que de tanto vernos por los pasillos, casi formamos ya una pequeña familia.

Al CENEXFOOD de Polonia, por acogerme con tanto cariño durante 4 meses y haber permitido formarme en la capacidad antioxidante de alimentos. No me olvido del personal del Food Science Department donde desarrollé mi trabajo, gracias a todos.

A mis compañeros de laboratorio: Montse, Verónica, María, Cristina, Martha, Alexia, Beatriz, Susana, Rafa, Loli, Rebeca, Teresa, M^a Carmen, Salud, Alberto y Marisela,

por su compañía, apoyo y amistad, así como por compartir buenos momentos que no olvidaré fácilmente.

A mis amigos de toda la vida, especialmente a Olga (mi "amigüita" del alma) y "Las Cristis", por haber estado ahí en todo momento que las he necesitado, en lo bueno y en lo malo. Ellas me ayudaron a hacerlo más llevadero.

Por último y de manera muy especial, a mis padres y hermana por su apoyo incondicional y a quienes debo todo.

Gracias a todos

Rosa

ÍNDICE

I. OBJETIVOS.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Leguminosas.....	3
2.1.1. Importancia económica y nutricional de leguminosas.....	5
2.1.1.1. Importancia económica y nutricional de guisantes.....	35
2.1.1.2. Importancia económica y nutricional de lentejas.....	39
2.1.1.3. Importancia económica y nutricional de judías.....	42
2.2. Procesos oxidativos y capacidad antioxidante de alimentos.....	46
2.3. Alimentos funcionales.....	56
2.3.1. Procesos tecnológicos para la obtención de harinas funcionales de leguminosas.....	58
 III. HARINAS FUNCIONALES DE GUISANTES Y LENTEJAS OBTENIDAS MEDIANTE LA ACCIÓN DE ENZIMAS.....	 73
3.1. Materiales.....	73
3.1.1. Leguminosas.....	73
3.1.2. Preparación de harinas funcionales de guisantes y lentejas.....	73
3.1.2.1. Optimización y obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la acción de α -galactosidasa endógena.....	73
3.1.2.2. Optimización y obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de α -galactosidasa comercial.....	74
3.1.2.3. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de fitasa comercial.....	75

3.1.2.4. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de tanasa comercial.....	75
3.1.2.5. Obtención de harinas funcionales de guisantes mediante la adición de viscozyme comercial.....	76
3.1.2.6. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la actuación de enzimas endógenas.....	76
3.2. Métodos de análisis.....	77
3.2.1. Determinación de humedad.....	77
3.2.2. Determinación de carbohidratos disponibles.....	77
3.2.2.1. Análisis de monosacáridos y disacáridos.....	77
3.2.2.2. Análisis de almidón total y disponible.....	81
3.2.3. Determinación de vitaminas hidrosolubles.....	83
3.2.3.1. Análisis de vitamina B ₁	83
3.2.3.2. Análisis de vitamina B ₂	88
3.2.4. Determinación de factores antinutritivos.....	91
3.2.4.1. Análisis de α -galactósidos.....	91
3.2.4.2. Análisis de inositol fosfatos.....	95
3.2.4.3. Análisis de la actividad inhibidora de tripsina.....	100
3.2.5. Tratamiento estadístico.....	102
3.3. Resultados sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas.....	103
3.3.1. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de guisantes y lentejas.....	103
3.3.1.1. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de guisantes.....	104

3.3.1.2. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de lentejas.....	110
3.3.2. Valoración de las harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas en óptimas condiciones de actuación de enzimas.....	117
3.4. Discusión sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas.....	132
3.5. Conclusiones sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas.....	142

IV. HARINAS FUNCIONALES DE JUDÍAS OBTENIDAS MEDIANTE FERMENTACIÓN..... 143

4.1. Materiales.....	143
4.1.1. Leguminosas.....	143
4.1.2. Harinas funcionales de judías.....	143
4.1.2.1. Optimización del proceso de fermentación.....	144
4.1.2.2. Obtención de harinas funcionales.....	145
4.2. Métodos de análisis.....	146
4.2.1. Determinación de humedad.....	146
4.2.2. Determinación de carbohidratos disponibles.....	147
4.2.2.1. Análisis de monosacáridos y disacáridos.....	147
4.2.2.2. Análisis de almidón total y disponible.....	149
4.2.3. Determinación de vitaminas hidrosolubles.....	149
4.2.3.1. Análisis de vitamina B ₁	149

4.2.3.2. Análisis de vitamina B ₂	150
4.2.3.3. Análisis de vitamina C.....	151
4.2.4. Determinación de vitaminas liposolubles.....	154
4.2.4.1. Análisis de carotenoides.....	154
4.2.4.2. Análisis de vitamina E.....	157
4.2.5. Determinación de factores antinutritivos.....	162
4.2.5.1. Análisis de α -galactósidos.....	162
4.2.5.2. Análisis de inositol fosfatos.....	163
4.2.5.2.1. Determinación de inositol fosfatos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	163
4.2.5.2.2. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ¹ H.....	163
4.2.5.3. Análisis de la actividad inhibidora de tripsina.....	165
4.2.6. Capacidad antioxidante.....	165
4.2.6.1. Determinación de glutatión reducido y oxidado.....	165
4.2.6.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa.....	169
4.2.6.3. Determinación de la capacidad para atrapar radicales peroxilo...172	
4.2.6.4. Determinación con liposomas de la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica.....	174
4.2.6.5. Determinación de la capacidad antioxidante total.....	178
4.2.7. Tratamiento estadístico.....	183

4.3. Resultados sobre la obtención de harinas funcionales de judías mediante fermentación.....	184
4.3.1. Optimización del proceso de fermentación de judías.....	184
4.3.2. Valoración de harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación.....	190
4.3.2.1. Valoración microbiológica de harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones.....	191
4.3.2.2. Valoración química de harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación.....	193
4.3.3. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN en patrones y en harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación natural.....	199
4.3.3.1. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ^1H en patrones.....	200
4.3.3.2. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ^1H en harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación natural.....	227
4.3.4. Valoración de la capacidad antioxidante de las harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones.....	250
4.4. Discusión sobre los resultados de harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación.....	262
4.5. Conclusiones sobre las harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación.....	276
V. CONCLUSIÓN GENERAL.....	278
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	279

I. OBJETIVOS

I. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido la obtención de harinas funcionales de leguminosas que presenten, en comparación con las leguminosas sin procesar, un menor contenido en factores antinutritivos, un nivel adecuado de nutrientes e incluso un contenido mayor en compuestos bioactivos.

Para alcanzar dicho objetivo se han desarrollado varias fases en las que se han llevado a cabo 2 tipos de procesos tecnológicos: enzimáticos y fermentativos.

a) *Harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante procesos enzimáticos*

- ♦ Estudio del contenido en determinados nutrientes (monosacáridos, disacáridos, almidón total y disponible, vitamina B₁ y vitamina B₂) y factores antinutritivos (α -galactósidos, inhibidores de tripsina, y ácido fítico) de guisantes (*Pisum sativum* var. Esla) y lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela).
- ♦ Optimización del proceso de actuación de la enzima α -galactosidasa (endógena o adición de enzima comercial) en harinas de guisantes y lentejas en base al contenido en el factor antinutritivo α -galactósidos.
- ♦ Valoración del contenido en nutrientes y factores antinutritivos de harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas en condiciones óptimas de actuación de las enzimas comerciales α -galactosidasa, fitasa, tanasa y viscozyme.

b) Harinas funcionales de judías obtenidas mediante procesos fermentativos

- ♦ Estudio del contenido en determinados nutrientes (monosacáridos, disacáridos, almidón total y disponible, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina C, carotenoides y tocoferoles), capacidad antioxidante (glutathion reducido y oxidado, actividad superóxido dismutasa, capacidad para atrapar radicales peroxilo, inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro* y capacidad antioxidante total) y factores antinutritivos (α -galactósidos, inhibidores de tripsina y ácido fítico) de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla).
- ♦ Optimización del proceso de fermentación (natural o con inóculo) en harinas de judías en base al contenido en factores antinutritivos (α -galactósidos, inhibidores de tripsina y ácido fítico) y calidad microbiológica.
- ♦ Valoración del contenido en nutrientes, factores antinutritivos, capacidad antioxidante y calidad microbiológica de harinas funcionales de judías obtenidas en condiciones óptimas de fermentación natural y con *Lactobacillus plantarum*, y en dichas harinas sometidas a calentamiento en autoclave.
- ♦ Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ¹H en harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación natural, con la finalidad de detectar la presencia de compuestos bioactivos.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Leguminosas

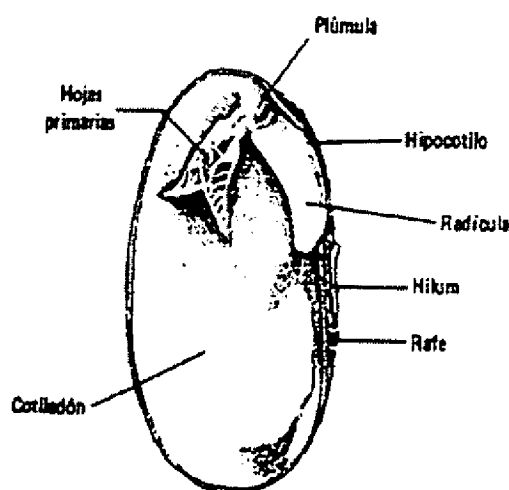
Las leguminosas-grano o legumbres son todas aquellas especies que pertenecen a la familia *Fabaceae*, y su principal utilidad es el aprovechamiento de la semilla. La palabra leguminosa procede del latín “legumen” o semilla con vaina. En España, el Código Alimentario Español indica como legumbres secas a “aquellas semillas secas, limpias, sanas y separadas de la vaina, que procedentes de la familia de las Leguminosas (*Fabaceae*), son de uso corriente en el país y directa o indirectamente resultan adecuadas para la alimentación” (Larralde, 2000). Constituyen unas de las familias más importantes y extensas del reino vegetal y han sido utilizadas por el hombre desde la más remota antigüedad (Deshpande, 1992). Las tribus de cazadores de hace miles de años pronto mostraron interés por centenares de especies silvestres que encontraban a su paso como complemento a su dieta prácticamente carnívora. Una vez constituidas las sociedades agrícolas, se empezaron a recolectar las primeras leguminosas domésticas. Ocurrió así en poblados de Oriente Próximo hace unos diez mil años, donde se encontraron junto con campos de trigo y cebada, en América, con yacimientos de maíz y judías y en Asia con mijo, soja o arroz. Entre todas las leguminosas disponibles, 20.000 especies, 200 se emplean en alimentación y alrededor de 20 son las que más frecuentemente son cultivadas y consumidas por el hombre, entre las que se encuentran los guisantes, lentejas, judías, garbanzos, habas y soja (Larralde, 2000).

Las semillas maduras están constituidas principalmente por 3 partes: la cubierta externa o testa, el cotiledón y el eje embrionario (Salunkhe y Kadam, 1989):

Testa. La envoltura o capa externa es de espesor y composición variable. Se caracteriza por ser una cutícula dura con gran cantidad de material fibroso como celulosas, hemicelulosas y lignina. Su función principal es la de proteger al embrión y el cotiledón del medio externo. Entre otras partes externas de la semilla se encuentra el hilum o cicatriz dejada por el funículo, que conecta la semilla con la placenta, el micropilo que es una abertura de la cubierta que se encuentra cerca del hilum a través de la cual se realiza la absorción de agua, y la rape, que proviene de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo.

Cotiledón. Representa la mayor parte de la semilla y es la que se utiliza como reserva de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales y vitaminas durante la germinación de la semilla.

Eje embrionario. Está compuesto por la radícula, el hipocótilo al que se encuentran unidos los cotiledones y que une la radícula con la plúmula, en la que se encuentran las primeras hojas verdaderas.



2.1.1. Importancia económica y nutricional de leguminosas

A pesar de que históricamente las leguminosas han sido fundamentales en la alimentación humana, su consumo ha descendido durante el pasado siglo en la mayoría de los países occidentales. Las transformaciones económicas, demográficas, sociales y culturales han dado lugar a modificaciones en la estructura de la dieta y en el consumo alimentario (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2002).

Al aumentar el nivel de vida de la población y alcanzar una cifra de ingresos adecuada, de forma automática se incrementa el consumo de proteínas de origen animal en detrimento de las de origen vegetal, provocando un descenso en el cultivo y consumo de leguminosas por el hombre (Larralde, 2000). Este fenómeno ha sido característico en los últimos años en los países industrializados, mientras que en los países que se encuentran en vía de desarrollo el consumo de leguminosas se mantiene como principal fuente proteica.

De acuerdo con la FAO (1996) este consumo per cápita fue de 2,6 Kg en Europa, 5,4 Kg en Asia, 8,4 Kg en África y 12 Kg en América Latina (Champ, 2001).

En España, el consumo de leguminosas sufrió una caída importante durante los años 60 y 70, pero empezó a recuperarse en los 90 debido, principalmente, a los preparados a base de leguminosas. Actualmente este consumo se cifra en 7-11 Kg/persona/año (Hedley, 2001), representando un 0,42% del gasto total en alimentación (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2002).

Según Gatel y Champ (1998) las principales razones del bajo consumo de leguminosas son tres:

- 1) Las leguminosas han gozado de mala imagen durante mucho tiempo, considerándolas como la carne del pobre, ya que siempre han formado parte de la dieta de la población con menos recursos económicos, dejando a la proteína de origen animal en manos de los países más desarrollados.
- 2) Requieren un elevado tiempo de cocinado, haciéndolo incompatible con el tipo de vida occidental, que demanda a la industria alimentaria alimentos listos para comer y no aquellos alimentos que necesiten demasiada atención culinaria, especialmente durante la jornada laboral.
- 3) La mayoría de las leguminosas presentan el fenómeno de la flatulencia, muy mal aceptado por la mayoría de la población.

El porcentaje de cultivos dedicados a leguminosas en Europa representa menos del 3% de la tierra arable, en contraste con Asia (9%) y África (8%). España es un caso especial ya que sólo utiliza el 1% del total (Pahl, 1998). Según la Asociación Española de Leguminosas (2002), en España, a pesar de ser un país con gran superficie agrícola, se ha de importar hasta el 80% de este producto. La producción de leguminosas para consumo humano ha pasado de unas 200.000 a 84.000 toneladas en 2001 y se tiene que importar de países como Canadá, México, Estados Unidos, Argentina o Turquía, por lo que España, junto con Italia, se ha convertido en el mayor importador de guisantes, lentejas y garbanzos de Europa (Gatel y Champ, 1998).

Tabla 1. Leguminosas grano. Datos de superficies, producciones y comercio exterior en diferentes países

Mundo y principales países	Superficie		Producción		Comercio exterior	
	Media 1989-91 miles de hectáreas	1999 miles de hectáreas	Media 1989-91 miles de toneladas	1999 miles de toneladas	Importaciones 1999 miles de toneladas	Exportaciones 1999 miles de toneladas
Mundo	68.257	70.217	55.542	57.010	7.457	7.717
Unión Europea	1.966	1.743	5.348	5.180	3.016	1.823
España	315	504	238	255	777	23
Turquía	2.196	1.406	1.946	1.369	88	355
Argentina	224	355	249	400	4	282
Canadá	392	1.640	640	3.479	94	2.097
Estados Unidos	882	941	1.623	1.864	202	615
México	1.953	1.929	1.290	1.392	168	165

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2002)

Si embargo, el reciente desarrollo de hábitos alimentarios vegetarianos, principalmente en el norte de Europa, está frenando el incremento del consumo de carne, junto con el episodio de “las vacas locas”. Las leguminosas son una excelente fuente de proteínas y fibra, además de estar libres de ácidos grasos saturados por lo que se les considera alimentos saludables. De hecho, en aquellas

áreas donde la incidencia de la diabetes tipo II, la obesidad y enfermedades cardiovasculares está presente, su demanda se está haciendo notable (Champ, 2001).

Poco a poco, la comunidad científica va demostrando que la alimentación desempeña un papel fundamental en la lucha contra las enfermedades crónicas, al mismo tiempo que aumenta el interés del consumidor por la relación dieta-salud, convirtiéndolo en su prioridad básica (Vasconcellos, 2000). Las leguminosas deben formar parte de esa prioridad debido a que son un alimento muy interesante desde el punto de vista nutricional, pero también desde el punto de vista agronómico y económico (Larralde, 2000).

Desde el punto de vista agronómico, una característica común a toda la familia es la presencia en las raíces de unos nódulos que encierran bacterias del género *Rhizobium*, que viven en simbiosis con ella, y que son capaces de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrato que utiliza la planta para la formación de sus propios tejidos. Este hecho hace que su cultivo sea de gran interés, ya que mejora las condiciones edafológicas del suelo, con el consiguiente ahorro de fertilizantes.

Desde el punto de vista económico, hay que señalar que una hectárea de terreno cultivada con leguminosas produce al año una media de 500-700 kg de leguminosas de un elevado contenido en proteínas vegetales, mientras que una misma hectárea dedicada a la alimentación del ganado, para proteínas animales, produciría al final unos 80 kg de proteínas comestibles (Larralde, 2000).

Otras ventajas que se derivan del mejor aprovechamiento de las leguminosas con fines económicos, son el aislamiento de distintos componentes de las semillas como proteínas, almidón o fibra, para usos tanto alimentarios como no alimentarios en la industria del papel, industria textil, plásticos o producción farmacéutica. Uno de los ejemplos es la producción de termoplásticos

biodegradables a partir de almidón aislado de leguminosas. El empleo de este producto obtenido a partir de guisantes, mejora considerablemente las propiedades de elongación de los plásticos. Su interés radica en la creación de nuevos mercados con productos alternativos más baratos, con mayor calidad que los productos petroquímicos tradicionales, menos tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente (Kozłowska y col., 1998).

Desde el punto de vista nutricional, las leguminosas han formado parte de la tradicional dieta mediterránea, atribuyéndoles efectos beneficiosos frente a patologías tan importantes como el cáncer, diabetes o enfermedades cardiovasculares. El valor nutritivo se debe esencialmente a su contenido proteico, a la vez que son fuente importante de carbohidratos complejos, algunos de absorción lenta como el almidón y otros no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria. Por otro lado, presentan un bajo contenido en lípidos (excepto en el caso de semillas oleaginosas), siendo mayoritariamente ácidos grasos poliinsaturados (Zulet y Martínez, 2001). En la Tabla 2 se resume la composición nutricional de las leguminosas-grano.

Tabla 2. Composición nutricional de las leguminosas-grano

NUTRIENTES	CONTENIDO
Proteínas	Globulinas 70% ³
	20-30% ¹ (50% Soja) ² Albúminas(12-20%) ³
	Glutelinas (12-20%) ³
Carbohidratos	Totales 24-68% ⁴
	Almidón 24-57% ⁴
Fibra alimentaria	8-28% ⁵
Lípidos	Ác. oléico (11-15%) ⁶
	1-5% ⁶ Ác.linoléico (20-65%) ⁶
	Ác linolénico (1-27%) ⁶
	(6-43% altramuz, soja, cacahuete) ⁶
Vitaminas	Tiamina (0,4 - 0,8mg/100g) ⁷
	Riboflavina (0,1 - 0,4mg/100g) ⁴
	Niacina (2mg/100g) ⁷
	Ác. Pantoténico (1,6 - 1,9mg/100g) ⁷
	Ác. Fólico (0,2 - 0,5mg/100g) ⁷
	C (0 - 10mg/100g) ⁸
	A (50 - 100 UI) ⁷
	E (0,09 - 3,54 α -TE mg/100g) ⁹
Minerales	Calcio (69 - 290mg/100g) ⁴
	Fósforo (250 - 550mg/100g) ⁴
	Hierro (5 - 12mg/100g) ⁴
	Magnesio (90 - 250mg/100g) ⁴
	Cobre (0,5 - 5mg/100g) ⁴
	Sodio (3 - 40mg/100g) ⁴

¹Hedley (2001); ²Mulimani y col. (1997); ³Fonseca y Bora (2000); ⁴Salunkhe y Kadam (1989);⁵Guillon y Champ (2002); ⁶Laralde (2000); ⁷Gatel y Champ (1998); ⁸Plaza y col. (2003); ⁹Wyatt y col. (1998)

Proteínas. El contenido en proteínas varía entre un 20-30% (Hedley, 2001), llegando incluso hasta el 50% en el caso de la soja (Mulimani y col., 1997). Las globulinas son las proteínas mayoritarias (70%), que se almacenan como reserva y se movilizan durante la germinación. Albúminas y glutelinas se encuentran en menor proporción (10-20%), y las prolaminas son minoritarias. La calidad de la proteína depende de su composición en aminoácidos constitutivos (Fonseca y Bora, 2000). La composición en todas las leguminosas prácticamente es la misma. Son ricas en lisina y deficientes en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), por lo que presenta un menor valor biológico que la proteína de origen animal, haciendo muy adecuada su suplementación con cereales, ricos en dichos aminoácidos y deficitarios en lisina (FAO, 1982).

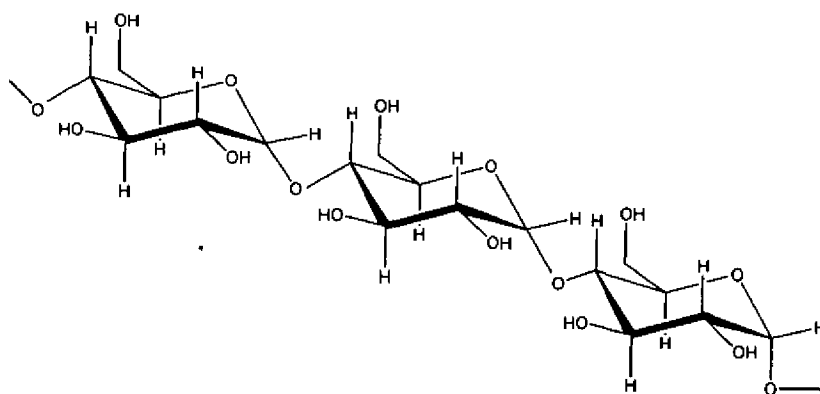
Lípidos. El contenido en lípidos de las leguminosas es bajo, oscilando entre 1-5% (Larralde, 2000), si bien hay notables excepciones como el cacahuete (43%), la soja (18%) y el altramuza (6-10%). En su mayoría presentan ácidos grasos esenciales, de buena calidad nutricional, ya que son principalmente poliinsaturados como el oleico (11-15%), linoleico (20-65%) y linolénico (1-27%) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1984).

Carbohidratos. Los carbohidratos son las moléculas orgánicas más amplia y abundantemente distribuidas en la naturaleza. Se consideran dentro del grupo de los nutrientes básicos por ser la principal fuente de energía de la dieta. Las leguminosas grano se caracterizan por tener un elevado contenido en carbohidratos (24-68%) (Salunkhe y Kadam, 1989). Los monosacáridos se encuentran en muy pequeñas cantidades y se ha detectado fructosa desde trazas hasta un 0,2% (Vidal-Valverde y col., 1992b, 1993a,b; Frías y col., 1994a,b; 1995, 1996a,b,d,e; Troszynska y col., 1995; Urbano, 1995; Sotomayor, 1997). El contenido en sacarosa es apreciable, variando notablemente incluso entre especies (1,6-3,9% en judías, 0,9-5,4% en guisantes, 1,1-3% lentejas) (Kozłowska y col., 2001). Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa son los

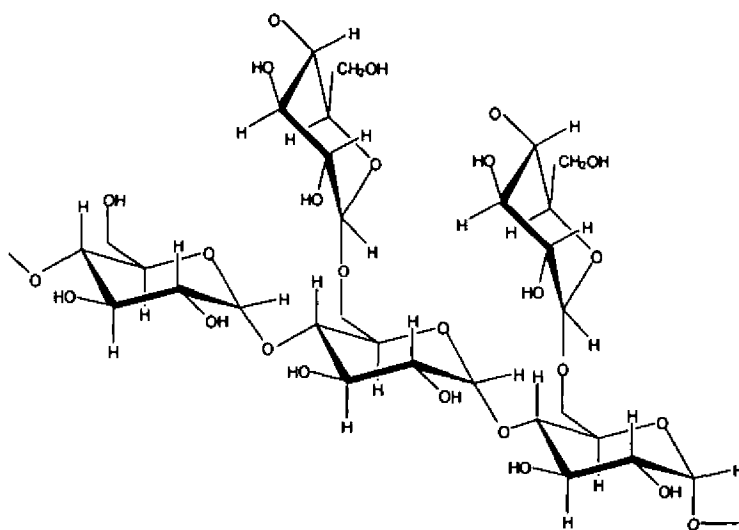
carbohidratos solubles más abundantes en las leguminosas. Son azúcares de bajo peso molecular cuyo papel parece estar relacionado con la protección de la semilla frente al frío y la deshidratación (Castillo y col., 1990) y su ingesta causa flatulencia, ya que no pueden ser hidrolizados en el tracto gastrointestinal por la ausencia de la enzima α -galactosidasa en el sistema digestivo de las especies monogástricas.

Almidón. El almidón es el componente mayoritario presente en las leguminosas grano de consumo humano. Representa el 51-67% en judías, 24,7-49,6% en guisantes y 40-57% en lentejas (Salunkhe y Kadam, 1989). Es el polisacárido de reserva de la planta, compuesto principalmente por una mezcla de amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida por una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. La disposición del carbono C-1 y el carácter del enlace α -glicosídico le confieren una conformación helicoidal. Aproximadamente el 25% del almidón está constituido por amilosa (BeMiller y Whistler, 1996). La amilopectina, por el contrario, está constituida por cadenas muy ramificadas de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y cadenas lineales con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Estas cadenas ramificadas están muy próximas entre sí y le confieren una gran rigidez a la estructura. La amilopectina constituye aproximadamente el 75% del almidón (BeMiller y Whistler, 1996) y parece que es la responsable de la cristalización de los gránulos del almidón.

Amilosa



Amilopectina



El almidón se encuentra localizado dentro de unos pequeños gránulos que presentan estructura cristalina, que se han observado por microscopía con luz polarizada (Frías y col., 1996c). Estos gránulos no son solubles en agua fría, aunque pueden absorber cierta cantidad de agua originando un pequeño hinchamiento. Al aumentar la temperatura se rompen los puentes de hidrógeno intramoleculares de las moléculas de amilosa y amilopectina disminuyendo el tamaño de las regiones cristalinas, la viscosidad aumenta considerablemente debido a que los gránulos se van adhiriendo unos a otros y se comienza a formar un gel. A medida que se aumenta la temperatura la presión en los gránulos es cada vez mayor, con lo que pueden llegar a romperse y disminuir la viscosidad. En este momento se produce la gelatinización y la temperatura alcanzada se denomina temperatura de gelatinización.

El almidón se hidroliza en el duodeno a disacáridos y trisacáridos por las secreciones pancreáticas de α -amilasa. Posteriormente, otras enzimas del intestino los transforman en glucosa, la cual es absorbida y transportada a través del torrente sanguíneo hasta los tejidos.

Fibra alimentaria. La fibra alimentaria está constituida por polisacáridos estructurales de la pared celular de la semilla e incluyen, celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas y otros componentes como gomas o mucílagos y lignina. Trowell (1976) definió la fibra alimentaria como "todos los polisacáridos y lignina de la dieta que son resistentes a las secreciones endógenas del tracto digestivo humano". De acuerdo a sus propiedades de solubilidad, la fibra se puede dividir en fibra insoluble y fibra soluble.

La fibra insoluble está constituida principalmente por celulosa, ciertas hemicelulosas y lignina. La celulosa está formada por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -(1-4). Al ser insoluble en agua y resistente a tratamientos con ácidos y bases diluidos presenta gran resistencia mecánica y química y gran capacidad para absorber agua e hincharse (Frías, 1992). Ciertas hemicelulosas, al igual que la celulosa, son resistentes a los enzimas digestivos del hombre, pero presenta mayor facilidad para ser atacada por los microorganismos del intestino grueso. En general, se trata de polímeros de pentosas y hexosas, así como ácidos galacturónicos. La lignina está constituida por polímeros aromáticos de alto peso molecular, cuya unidad estructural es el anillo de fenilpropano, unidos entre ellos mediante enlaces covalentes carbono-carbono en una red tridimensional. Su función es dar rigidez a la pared celular y unir células formando estructuras fuertes.

La fibra soluble la componen principalmente sustancias pécticas, hemicelulosas solubles, gomas y mucílagos. Las sustancias pécticas son un grupo complejo de derivados de polisacáridos formado por moléculas de ácido galacturónico que se unen mediante enlaces α -(1-4). Las gomas son polisacáridos como galactanos o xilanos, con carácter hidrofílico que dan lugar a soluciones viscosas cuando se tratan con agua caliente o fría y de ahí que se utilicen en la industria alimentaria para dar la consistencia adecuada a ciertos productos. Los mucílagos también son polisacáridos formados por galactomananos o

xiloarabinanos solubles en agua, muy utilizados en los trastornos del intestino grueso.

La fracción de fibra insoluble participa de manera activa en la función gastrointestinal. La fracción de fibra soluble ejerce su acción sobre el metabolismo glucídico y lipídico (Anderson y col., 1990, Hughes, 1991) y puede también contribuir a la producción de flatulencia (Granito y col., 2002).

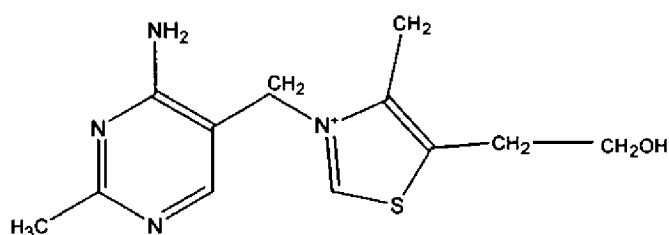
Dietas ricas en fibra son muy recomendables para paliar ciertas enfermedades occidentales como estreñimiento, varices, hemorroides o enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y cáncer de colon (Burkitt y col., 1972; Bjorck y col., 1994; Anderson y col., 1986; Thebaudin y col., 1997). Las leguminosas tienen un importante contenido en fibra (11-25%) y su consumo puede contribuir a mejorar estas patologías.

Vitaminas. Las vitaminas son sustancias químicas que se encuentran de forma natural y en cantidades muy pequeñas en los alimentos, de ahí que reciban el nombre de micronutrientes. Debido a que el ser humano no es capaz de sintetizarlas, es necesario que se ingieran a través de la dieta.

Hay que tener en cuenta que cada una de las vitaminas debe su actividad vitamínica total al conjunto de vitámeros o sustancias que le son químicamente afines, pero que presentan diferencias en el grado de actividad que aportan debido a diferencias en su estructura química. Por lo tanto, es importante determinar el contenido de cada vitámero por separado a la hora de valorar la presencia de una vitamina en un alimento, transformar todos los vitámeros en uno de ellos o valorar el de mayor actividad biológica. Igualmente importantes son las provitaminas o precursores de las vitaminas, que no son vitaminas en sí mismas pero que pueden transformarse en ellas al ser metabolizadas por el ser vivo.

Las vitaminas se pueden clasificar en hidrosolubles (complejo vitamínico B, vitamina C y ácido fólico) y liposolubles (vitamina A, D, E y K) en función de sus propiedades de solubilidad. A continuación se describe brevemente las características de las vitaminas objeto de estudio.

La vitamina B₁ o tiamina puede ser sintetizada en el intestino humano por los distintos microorganismos presentes pero, debido a que la cantidad producida es insuficiente, debe ser ingerida a través de la dieta. Se encuentra en los alimentos en forma desfosforilada mono-, di-, o trifosforilada, siendo la forma difosforilada, difosfato de tiamina (TDP) también conocida como pirofosfato de tiamina (TPP) o cocarboxilasa, el coenzima activo principalmente encontrado en las células.



Tiamina

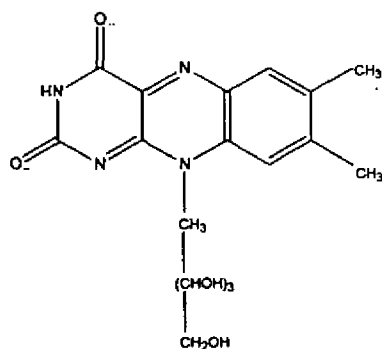
(3-(4'-amino-2'-metil-pirimidin-5'-ilmetil)-5-(2-hidroxoetil)-4-metilazol)

La tiamina se absorbe por transporte activo en el yeyuno y las formas coenzimáticas se hidrolizan por fosfatasas intestinales. La tiamina se fosforila en las células de la mucosa a pirofosfato de tiamina y así es transportado hasta el hígado por la circulación portal. Una vez utilizada es degradada en el hígado, originando una serie de metabolitos que se eliminan por la orina (Machlin, 1995).

La tiamina juega un papel importante en el metabolismo de los hidratos de carbono ya que es la responsable de la descarboxilación oxidativa del piruvato a

acetil-CoA, indispensable para que el sustrato oxidable se incorpore al ciclo de Krebs. De este modo, la carencia de tiamina provoca una alteración en dicho metabolismo y afecta a todos los tejidos que dependan del suministro de energía, como cerebro y músculo cardíaco. Su deficiencia ocasiona una alteración del sistema central, sistema cardíaco y aparato gastrointestinal, conocida como “Beri beri”. La sintomatología se caracteriza por confusión mental, desgaste muscular, edema, parálisis periférica, taquicardia y cardiomegalia. Las leguminosas son una fuente importante de tiamina (0,4-0,8 mg/100g) (Gatel y Champ, 1998; Vidal-Valverde y col., 2003), encontrándose además en gran variedad de alimentos animales y vegetales como las carnes magras, germen de trigo, yema de huevo, pescado y cereales.

La vitamina B₂ o riboflavina es un pigmento amarillo fluorescente que es sintetizado de forma natural por las plantas y algunos microorganismos, pero no así por los animales superiores, por lo que es necesaria su ingestión a través de la dieta. Se puede encontrar en la naturaleza desfosforilada o fosforilada en forma de dos coenzimas activas: flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD).



Riboflavina

(7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxacina)

La riboflavina se libera por la acción de pirofosfatasas en el intestino delgado y se absorbe en el tramo proximal por transporte saturable, es decir, la absorción aumenta con la presencia de riboflavina en el tracto gastrointestinal. Es transportada en la sangre por la albúmina o inmunoglobulinas hasta el hígado donde se produce su degradación. Los productos de su metabolismo se eliminan por la orina.

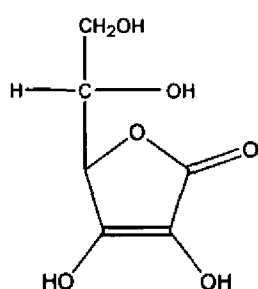
La riboflavina es un componente esencial en la producción de energía por la cadena respiratoria, tanto en el metabolismo de los carbohidratos como de los ácidos grasos y aminoácidos. Sus dos coenzimas, FMN y FAD, son los responsables de su actividad biológica. Catalizan reacciones de óxido-reducción en las células y funcionan como transportadoras del H_2 en el sistema mitocondrial del transporte de electrones. El FMN es necesario para la conversión de la piridoxina fosforilada (vitamina B_6) hacia su coenzima funcional y el FAD para la conversión de triptófano en niacina (Cadenas y Packer, 2002)

Su deficiencia provoca alteraciones en los ojos (fotofobia, lagrimeo, pérdida de agudeza visual), boca (quelosis, agrietamiento en los ángulos de la boca) o erupción grasa en la piel de los pliegues nasolabiales.

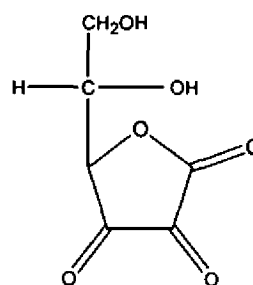
Las mejores fuentes de riboflavina son las carnes (hígado, riñón), la leche y sus derivados, la levadura de cerveza, los huevos y los vegetales de hojas verdes. Las leguminosas también son una fuente importante de esta vitamina y aportan cantidades entre 0,1-0,4 mg/100g (Salunkhe y Kadam, 1989).

Como vitamina C se incluyen a todos los compuestos que presentan la actividad biológica del ácido L-ascórbico. Éste es la forma biológicamente activa de la vitamina C ya que su esteroisómero, el ácido isoascórbico o sus ésteres, solo presentan una pequeña actividad respecto a él. En solución se encuentra en un equilibrio de óxido-reducción con su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (Davey y col., 2000).

El ácido ascórbico está ampliamente distribuido en el reino vegetal y animal y es de vital importancia en la nutrición, por ello es necesaria su ingesta a través de la dieta. El ácido isoascórbico, en cambio, es una estructura sintetizada comercialmente y que no se encuentra de forma natural en los alimentos.



Ácido L-ascórbico



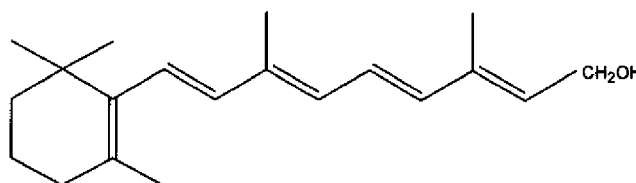
Ácido dehidroascórbico

La vitamina C se absorbe en el intestino delgado mediante un mecanismo de transporte dependiente de sodio. Participa en la conversión de tirosina a dopamina y otros neurotransmisores, además de estar relacionado con la síntesis de esteroides. Es necesaria en el metabolismo del colágeno ya que actúa como cofactor en la transformación de procolágeno a colágeno. También es bien conocido que el ácido L-ascórbico presenta propiedades antioxidantes debido principalmente al equilibrio que mantiene con su forma oxidada dehidroascórbico, así como a su capacidad para transportar electrones. Por último, está relacionada con algunas funciones de la respuesta inmune, biodisponibilidad del hierro y reacciones antihistamínicas (Davey y col., 2000).

La deficiencia de vitamina C provoca la enfermedad conocida como “escorbuto”, caracterizada principalmente por anemia, alteraciones en los dientes, encías, cartílagos, tejido conectivo, lesiones en la piel, hemorragias intestinales y oculares. Provoca fatiga, anorexia, dolor muscular y una gran susceptibilidad a la infección y el estrés.

Los vegetales y frutas son la primera fuente de vitamina C en la dieta. En cuanto a alimentos de origen animal cabe destacar el hígado y el riñón. Su contenido en las leguminosas es bajo (0–10mg/100g) (Plaza y col., 2003).

La vitamina A es el término que se refiere a todos los compuestos isoprenoides que poseen la actividad biológica del todo-trans retinol.



Todo-trans-retinol

Los retinoides son estructuras químicas que presentan actividad vitamínica A pero que difieren estructuralmente del todo-trans retinol (p.e. 13-cis-retinol, 9-cis-retinol o 9,13-di-cis retinol). Están formados por un anillo β -ionona que posee una cadena de tres unidades de isoprenoides unidos por la posición 6 al anillo.

La vitamina A o retinol se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en forma esterificada con ácidos grasos (p.e. ácido palmítico). El retinol de la dieta normalmente se encuentra en forma esterificada y sus ésteres son completamente hidrolizados en el intestino delgado a retinol libre y así es transferido a las células de la mucosa intestinal donde de nuevo es esterificado y transportado por las lipoproteínas en la sangre.

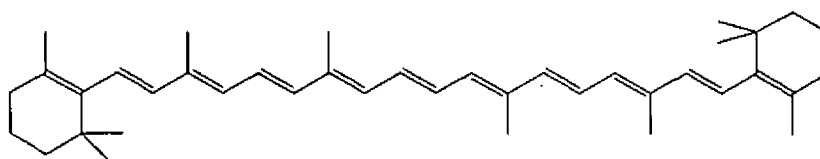
La vitamina A participa en el crecimiento y diferenciación celular. Constituye un metabolito esencial en el ciclo visual y ejerce su efecto en la respuesta inmune y desarrollo embrionario. Además es considerada como un

posible agente anticancerígeno por sus propiedades para reestablecer la normalidad en la diferenciación celular (Hicks, 1983).

La xeroftalmia o ceguera nocturna es uno de los principales síntomas de déficit de vitamina A. Otros signos de deficiencia son las lesiones en la piel, queratinización epitelial, susceptibilidad a las infecciones y pérdida del apetito.

Las fuentes más importantes de vitamina A son el hígado, pescado y sus aceites, mantequilla, huevos y leche. En leguminosas su contenido oscila entre 50-100 UI (Gatel y Champ, 1998).

Los carotenoides no presentan actividad vitamínica A, pero pueden llegar a tenerla por las transformaciones que se producen en su metabolismo, de ahí que se conozcan como compuestos con carácter pro-vitamina A. Los carotenoides engloban a su vez a los carotenos y xantofilas, diferenciándose unos de otros porque las segundas están oxigenadas. Las estructuras están formadas por 8 unidades de isoprenos unidos mediante enlaces cabeza-cola. El más representativo y con mayor actividad biológica es el β -caroteno que posee 2 anillos β -ionona en su estructura unidos por una cadena hidrocarbonada.



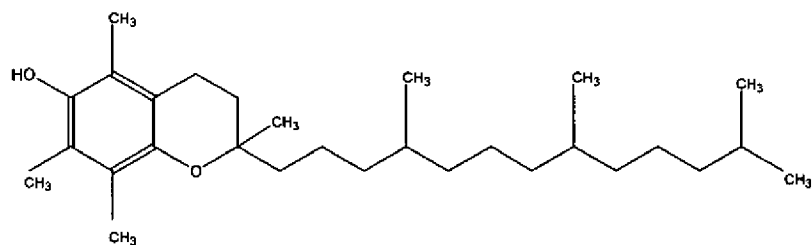
β -Caroteno (pro-Vitamina A)

El β -caroteno ingerido en la dieta es convertido a retinol por un mecanismo enzimático y así transportado por las lipoproteínas en la sangre. Esta reacción ocurre en la pared intestinal y en el hígado de muchas especies. Así mismo, los carotenoides son considerados como agentes antioxidantes por su

capacidad para proteger a las células y tejidos de los efectos dañinos de la luz y de los radicales libres (Viljanen y col. 2002).

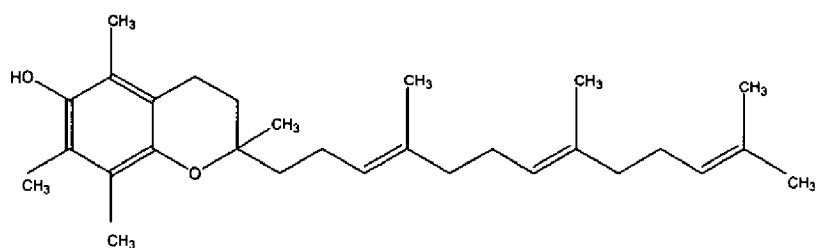
Los carotenoides están ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal, siendo los más importantes las zanahorias, los vegetales de hojas verdes oscuras y las frutas. En leguminosas el contenido de β -caroteno es bajo (no detección y 142 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (soja y lupino, respectivamente)) (Kantha y Erdman, 1987; El-Difrawi y Hudson, 1979; Monma y col., 1994).

La vitamina E es un término general que engloba al conjunto de moléculas liposolubles que exhiben la actividad biológica del α -tocoferol. Todos los homólogos derivan del tocol y se pueden clasificar en dos grupos: Tocoferoles (α , β , δ , y γ) donde la cadena isoprénica está saturada, y tocotrienoles (α , β , δ , y γ) donde la cadena isoprénica está insaturada, siendo el α -tocoferol el que presenta la mayor actividad biológica (1,49 IU/mg).



α -tocoferol

(α -5,7,8-trimetil)-2-metil-2(4',8',12'-trimetiltridecil)-croman-6-ol



α -tocotrienol

La vitamina E está muy extendida en el reino animal y vegetal, siendo de vital importancia en la nutrición y en la salud porque está directamente relacionado con las funciones reproductivas.

Aproximadamente entre el 20 y el 40% de la vitamina E ingerida es absorbida e hidrolizada en la mucosa duodenal. Después se incorpora a las micelas de la membrana celular junto con otros lípidos y, por un mecanismo de difusión, se enlaza con las lipoproteínas, que la transportan por el torrente sanguíneo hasta, principalmente, aquellos tejidos donde queda almacenada como tejido adiposo, hígado y músculo.

La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble biológico, siendo la responsable de proteger a las membranas celulares de la oxidación lipídica por parte de los radicales libres, como por ejemplo los peróxidos. Secuestra a estos radicales gracias a la estructura de su anillo hidroxicromano que tiene la capacidad de promover una reacción de óxido-reducción. Además, juega un papel importante en la inhibición de formación de mutágenos y repara el ADN. Varios estudios indican que la capacidad antioxidante de la vitamina E tiene efectos beneficiosos en la prevención de varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas (Packer y Fuchs, 1993; Diplock, 1994; Cadenas y Packer, 2002).

El principal síntoma de deficiencia de vitamina E se manifiesta en forma de anemia hemolítica y alteraciones en la función reproductora. A nivel celular, provoca un incremento de la oxidación de las membranas celulares, descenso de la producción de energía en la mitocondria y mutaciones en el ADN (Johnson, 1979; Davey y col., 2000, Cadenas y Packer, 2002).

Las fuentes más importantes de vitamina E son los aceites de semillas de cereales y leguminosas oleaginosas (0,09-3,54 α -TE mg/100g) (Wyatt y col., 1998) margarinas, frutas, vegetales, nueces, huevo e hígado.

Minerales. Las leguminosas son abundantes en minerales como el calcio, fósforo, hierro, magnesio, cobre y sodio, variando dentro de cada especie según la variedad, el clima y contenido mineral del suelo. Sin embargo, su biodisponibilidad es menor que los minerales de origen animal, ya que los vegetales presentan distintas sustancias como fitatos y oxalatos que forman complejos insolubles con ellos dificultando su absorción en el intestino (Zyta, 1992; Sandberg y Andlid, 2002; Walter-López y col., 2002).

Las leguminosas a pesar de que contienen innumerables propiedades nutritivas muy positivas, presentan una serie de compuestos antinutritivos, generalmente metabolitos secundarios de la planta, que influyen negativamente en su calidad nutricional.

Factores antinutritivos. Se define de forma genérica a los factores antinutritivos como aquellos compuestos que están presentes de forma natural en los alimentos y actúan provocando una pérdida de nutrientes esenciales o interfiriendo en su utilización y función metabólica (Gontzea y Sutzescu, 1968). La presencia de estos factores antinutritivos en el reino vegetal parece estar relacionado con la capacidad de perturbar procesos metabólicos de microorganismos o insectos y así proteger a la planta de su posible ataque y favorecer su crecimiento y desarrollo (Huisman y Tolman, 1992).

Las Tablas 3 y 4 recogen los factores antinutritivos de leguminosas, dependiendo de su estabilidad frente al calor, y su efecto fisiológico.

Tabla 3. Factores antinutritivos termolábiles de leguminosas y su efecto fisiológico

Componentes	Efecto Fisiológico
Compuestos antivitaminicos:	
Vitamina D	Raquitismo Necrosis Hepática
Vitamina E	Oxidación vitamina E Distrofia muscular, Anemia
Compuestos goitrogénicos	Bocio
Sustancias cianógenas	Producción cianhídrico
Taninos condensados	Reducción digestibilidad proteica Inhibición enzimas
Lectinas	Retraso crecimiento
Inhibidores enzimáticos	
Inhib. de tripsina	Inhibición de tripsina, hipertrofia pancreática, pérdida de cistina
Inhib. de quimotripsina	Inhibición de quimotripsina
Inhib. de α -amilasa	Inhibición de α -amilasa, dificultad utilización carbohidratos

Fuente: Liener I.E. (1980)

Tabla 4. Factores antinutritivos termoestables de leguminosas y su efecto fisiológico

Componentes	Efecto Fisiológico
α -Galactósidos	Flatulencia
Glucósidos de pirimidina	Anemia Hemolítica
Fitatos	Baja disponibilidad mineral
Saponinas	Hemolisis
Alcaloides	Tóxicos
Aminoácidos Tóxicos	Parálisis nerviosa
Aminoácidos racémicos	Producción de D-aa
Alergenos	Reacciones alérgicas

Fuente: Liener I.E. (1980)

α-Galactósidos. Los α -galactósidos son los carbohidratos solubles más ampliamente distribuidos en las leguminosas, también conocidos como galactooligosacáridos u oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Kadlec y col., 2001).

El α -galactósido más pequeño es la rafinosa, formada por una molécula de galactosa unida mediante enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ a la sacarosa. Sucesivas adiciones de galactosa originan estaquiosa y verbascosa. El ciceritol es un pseudo-trisacárido perteneciente a dicha familia.

Las estructuras de los α -galactósidos son:

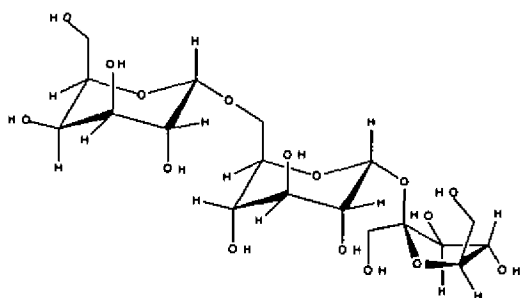
Rafinosa : α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Glu(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru

Ciceritol : α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-quiro-inositol

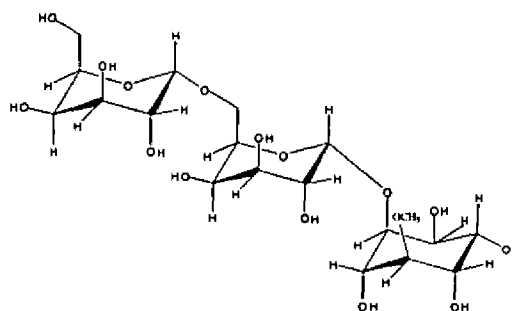
Estaquiosa: α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Glu(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru

Verbascosa: α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Gal(1 \rightarrow 6)- α -D-Glu(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru

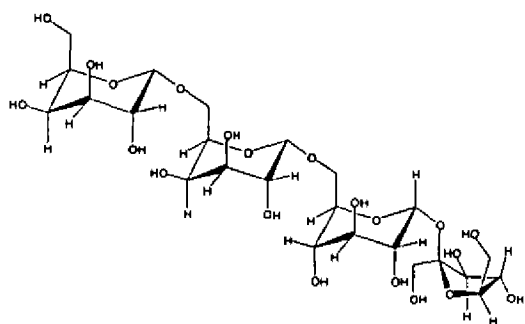
Donde: Gal = galactosa, Glu = glucosa, Fru = fructosa

Estructuras de los α -galactósidos

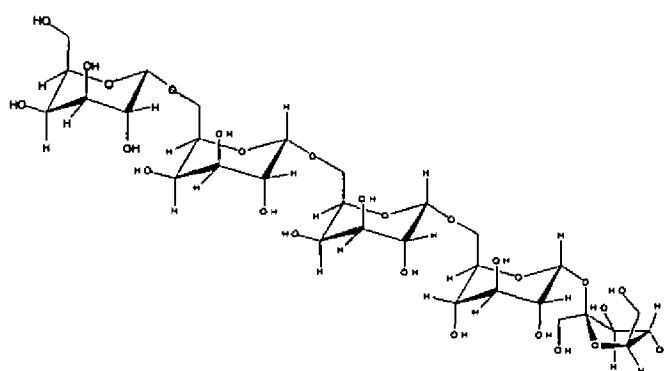
rafinosa



ciceritol



estaquiosa



verbascosa

Estos compuestos son sintetizados por la galactinol sintasa durante el crecimiento de la semilla y depositados en órganos de reserva, movilizándose durante los primeros estadios de la germinación (Castillo y col., 1990). Tienen una función importante en el crecimiento y desarrollo de la planta (Dey, 1990). En las leguminosas sirven como metabolitos de transporte de esqueletos carbonados, participan activamente en la aclimatación de la planta al frío, ya que se ha comprobado que la enzima galactinol sintasa se activa cuando la planta se ve sometida a bajas temperaturas, y confieren tolerancia a la semilla a la desecación durante su maduración (Castillo y col., 1990).

Los α -galactósidos son considerados factores antinutritivos porque las especies monogástricas, como el hombre, no poseen la enzima α -galactosidasa capaz de hidrolizar los enlaces α -(1,6) entre las moléculas de galactosa. Estos compuestos, por tanto, no son degradados en el intestino delgado, pasando prácticamente intactos al colon donde son fermentados por la flora microbiana presente. De este modo se pueden generar considerables cantidades de gas, compuesto principalmente por metano, hidrógeno, dióxido de carbono y elementos traza fuertemente olorosos como aminas volátiles y ácidos grasos de cadena corta (Rackis, 1975). Así, los α -galactósidos son considerados como los factores antinutritivos más importantes en la génesis del flatus, aunque otros compuestos pueden contribuir también a la producción de gas (Olson, 1982) como la fracción soluble de la fibra, almidón resistente, metilmercaptanos, fructanos y fructooligosacáridos.

La flatulencia, del latín "*flatulentus, flatus*" es la excesiva acumulación de aire o gas en el estómago o intestino. Da lugar a calambres y ruidos abdominales e intestinales, dolor, náuseas y diarrea, ocasionando malestar personal y social (Price y col., 1988). Las leguminosas son uno de los alimentos que generan

mayor cantidad de flatulencia, y es la causa más importante del rechazo a su consumo (Salunkhe y Kadam, 1989).

El contenido en α -galactósidos en leguminosas varía mucho entre especies, incluso entre variedades dentro de una misma especie, pero sus rangos oscilan entre 0,4 y 10 g/100g en leguminosas grano de consumo humano.

Tabla 5. Contenido en α -galactósidos de leguminosas

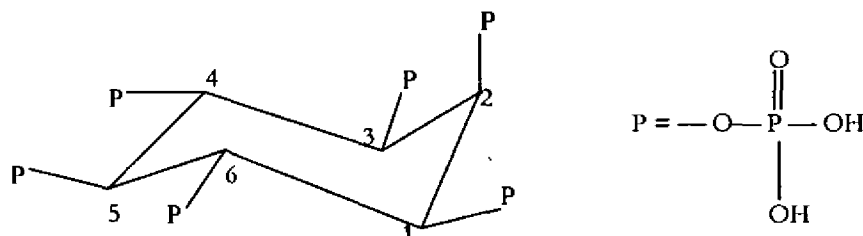
	Judías (<i>P vulgaris</i>) (<i>V sinensis</i>)		Guisantes	Lentejas	Garbanzos	Habas
Rafinosa (%)	0,2-2,5	0,4-1,2	0,4-2,3	0,1-0,8	0-0,3	0,1-1,5
Ciceritol (%)	–	–	–	0,2-2,1	1,2-3,1	–
Estaquiosa (%)	0,2-3,9	2,0-3,6	0,3-4,2	1,1-4,0	0,4-2,0	0,2-1,6
Verbascosa (%)	0,1-1,8	0,6-3,1	0-4,3	0-6,4	Trazas-0,4	1,1-2,4
Total α -galactósidos (%)	0,4-8,0	3,0-7,9	2,3-9,6	1,8-7,5	2,0-7,6	1,0-4,5

Fuente: Kozłowska y col. (2001); Prinyawiwatkul y col. (1996)

Destaca la presencia del ciceritol en lenteja que, junto con el garbanzo, son las especies donde se ha encontrado dicho α -galactósido (Quemener y col., 1983; Vidal-Valverde y col., 1992b, 1993a,b; Bernabé y col., 1993; Frías y col., 1994a,b; 1995, 1996a,d,e; Urbano y col., 1995; Sotomayor, 1997).

Los α -galactósidos son termoestables, pero solubles en agua, por lo que el remojo previo a otros procesos a los que se someten a las leguminosas es muy importante para su eliminación.

Ácido fítico. El ácido fítico es el éster hexafosfórico del ciclohexano o ácido inositol hexafosfórico (IP₆). El modelo más aceptado fue el descrito por Anderson en 1914 y corresponde al 1,2,3,4,5,6-hexaquis dihidrógeno fosfato.



El ácido fítico se sintetiza por la conversión de D-glucosa a 1-L-mio-inositol por la enzima 1-L-mio-inositol-1-P sintasa en un primer paso para la biosíntesis del resto de inositol fosfatos superiores durante el desarrollo de la semilla (Brearley y Hanke, 1996), y se acumula hasta un 60-80% en forma de fitato magnésico y potásico en unas estructuras denominadas globoides localizadas en el interior de los corpúsculos de proteínas de las células del cotiledón (Stephens e Irvine, 1990; Reddy y col., 1982; Lott, 1986; Thompson, 1993). Su papel fundamental parece estar relacionado con la reserva de fósforo de la planta, para ser utilizado posteriormente durante la germinación de las semillas (Cosgrove, 1980). Torre y col. (1991) también le atribuyen un papel de reserva energética, como fuente de cationes y Scott (1991) como fuente de mioinositol, precursor de los polisacáridos que constituyen la pared celular, y antioxidante, previniendo la peroxidación de los lípidos.

El ácido fítico es una molécula con carga fuertemente negativa (Crean y Haisman, 1963) y esto hace que su estructura sea altamente reactiva, ya que al encontrarse en forma de anión presenta un gran potencial para unirse a cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} a través de los grupo fosfato. Existen múltiples modos de unión con un catión: mediante un solo grupo fosfato, entre dos grupos fosfato de una misma molécula de ácido fítico o entre dos grupos

fosfato de dos moléculas distintas de ácido fítico. Incluso cabe la posibilidad de la unión de distintos cationes a una sola molécula de ácido fítico (Gosselin y Coghlan, 1953). De este modo, se forman complejos insolubles e indigeribles que disminuyen la biodisponibilidad de estos minerales (Zhou y col., 1992), puesto que la solubilidad de un mineral es la propiedad más importante y necesaria para que sea absorbido eficientemente en el tracto gastrointestinal. Si bien es cierto que los inositol fosfatos más fosforilados (IP_6 e IP_5) forman estos complejos, los inositol con 4 o menos grupos fosfato no parecen poseer ningún efecto negativo sobre la absorción mineral (Lönnerdal, 1989). Es más, es importante conocer el mecanismo de desfosforilación del ácido fítico puesto que es actualmente bien conocido que los inositol menos fosforilados (IP_1 - IP_4) actúan como mensajeros intracelulares (Phillippy, 1989; Shamsuddin, 2002). El inositol 1,4,5- tri-fostato (IP_3) ha sido sugerido como un segundo mensajero que participa en funciones celulares tales como la mitosis celular via movilización del calcio intracelular (Zhou y Erdman, 1995; Shamsuddin, 2002).

El ácido fítico interacciona fuertemente con los residuos básicos de las proteínas vegetales que disponen de carga positiva cuando el pH del medio es ácido, produciendo una gran interacción electrostática entre ambas moléculas, que va a depender del número de cargas positivas y de los grupo amino terminales de la proteína (Cheyran, 1980). Cuando el pH es superior a 5, al contrario de lo que cabría esperar ya que ambas moléculas están cargadas negativamente, la interacción también se produce (O'Dell y De Boland, 1976). Esta vez siendo necesaria la mediación de los cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} . En cualquier caso, la formación de estos complejos hace a las proteínas resistentes a la degradación enzimática y, por tanto, reduce su digestibilidad y solubilidad (Cranwell y Liebman, 1989).

El ácido fítico se encuentra en elevadas concentraciones en las semillas de leguminosas (0,40-2,06%) y cereales (Reddy y col., 1989b). En la mayoría de

ellas, el fósforo del ácido fítico representa aproximadamente el 80% del fósforo total de la semilla (Reddy y col., 1989b).

Tabla 6. Contenido en ácido fítico de leguminosas

		Contenido (%)
Guisantes		0,4
Lentejas		0,27-1,05
Judías	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,74-1,78
	<i>Vigna sinensis</i>	0,37-1,45
Soja		1,00-2,22
Garbanzo		0,28-1,26

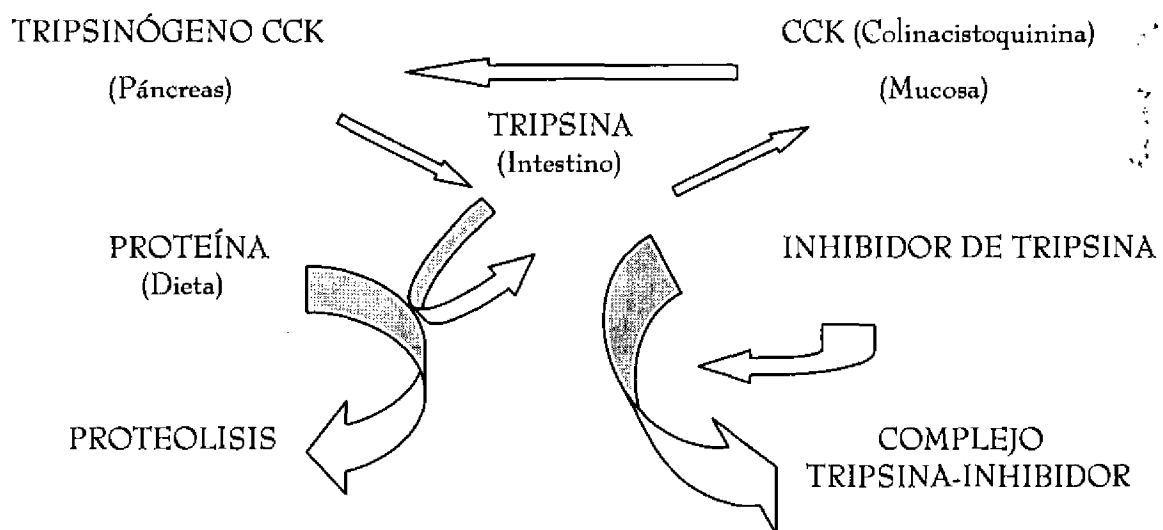
Fuente: Reddy y Sathe (2002)

Inhibidores enzimáticos. Los inhibidores enzimáticos son otros factores antinutritivos que interfieren en la actividad de los sistemas enzimáticos del aparato digestivo inhibiendo específica o inespecíficamente enzimas necesarias para la asimilación de nutrientes. Los inhibidores de proteasas son capaces de unirse a determinadas enzimas proteolíticas impidiendo que ejerzan su acción sobre las proteínas, dificultando su asimilación y utilización. Los inhibidores de proteasas participan durante los procesos de germinación de la planta regulando la actividad catabólica de determinadas enzimas endógenas, además de bloquear los sistemas de acción de los enzimas microbianos acoplándose a ellos e impidiendo su ataque (Preston y Kruger, 1976). Los más importantes dentro de este grupo son dos serín-proteasas: Inhibidor de tripsina e inhibidor de quimotripsina.

En vegetales fundamentalmente abundan en las semillas de leguminosas (2% del total del contenido proteico) (Liener, 1976), cereales, y en tubérculos como patata y remolacha. Se detectaron por primera vez en un extracto acuoso de soja y fueron aislados por Kunitz en 1945 (Kunitz, 1945).

Se dividen en dos familias de acuerdo a los modelos propuestos por Kunitz (Koide y col., 1973) y Bowman-Birk (Odani e Ikenaka, 1973). El primer modelo propuesto se trata de una proteína de 20.000 Da de peso molecular con 181 aminoácidos que posee dos puentes disulfuro. Su conformación es en α -hélice abierta e inhibe a la tripsina. El segundo modelo es una proteína de 8.000 Da de peso molecular con 71 aminoácidos que posee siete puentes disulfuro. Su estructura es compacta e inhibe a la tripsina y a la quimotripsina.

La tripsina se sintetizan en el páncreas y su inhibición provoca un incremento de la secreción pancreática y, por último, hipertrofia pancreática (Liener y Kakade, 1980). Green y Lyman (1972) propusieron la activación "feed-back" del páncreas por la inhibición de la tripsina en el lumen intestinal, según el siguiente esquema.



Cuando el inhibidor de tripsina se une a la tripsina formando el complejo irreversible tripsina-inhibidor, los niveles de la enzima descienden en el intestino y, de este modo, se alerta a la CCK en la mucosa para que se produzca más tripsina a partir del tripsinógeno pancreático. Como consecuencia de una ingesta continuada de inhibidor de tripsina se puede originar hipertrofia e hiperplasia

pancreática. Además la proteína de la dieta no es hidrolizada y, a largo plazo, se puede ocasionar un retraso en el crecimiento.

En la Tabla 7 se muestra la actividad inhibidora de tripsina en algunas leguminosas.

Tabla 7. Actividad inhibidora de tripsina de algunas leguminosas

TIU/mg		
Guisantes		2,9-10,8 ¹
Lentejas		5,3-6,4 ²
Judías	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,3 ³
	<i>Vigna sinensis</i>	29,65 ⁴
Soja		66 ⁵
Garbanzo		10,43 ⁶

Fuente: ¹Valdebouze (1980); ²Vidal-Valverde y col. (1994); ³Granito y col. (2002); ⁴Ibrahim (2002); ⁵Della Gatta y col. (1988); ⁶Vidal-Valverde y col. (1993b).

Lectinas. Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas vegetales capaces de unirse reversiblemente a restos azucarados de glicoproteínas situadas en la superficie celular, originando la aglutinación de los glóbulos rojos y una severa depresión del crecimiento, como consecuencia de su unión a receptores específicos de las células de la mucosa intestinal y, por tanto, reduciendo la capacidad de absorción de nutrientes en el intestino delgado (Pusztai, 1987).

Taninos. Los taninos son compuestos de naturaleza polifenólica con capacidad de precipitar proteínas formando complejos insolubles durante la digestión e impidiendo su asimilación (Jansman, 1993). Por otro lado, también tienen la capacidad de unirse a cationes di y trivalentes como por ejemplo el hierro, disminuyendo su biodisponibilidad (Partearroyo y col., 1995). Algunas enzimas

como la tripsina, α -amilasa y lipasa son inhibidas por estos compuestos, lo que provoca una disminución en la digestibilidad de carbohidratos, proteínas y lípidos (Quesada y col., 1995)

Glucósidos cianogénicos. Los glucósidos cianogénicos deben su carácter antinutritivo a que liberan al medio ácido cianhídrico, producto tóxico que además puede dar lugar a tiocianato, agente bociógeno que interfiere en la captación del yodo por el tiroides (Montgomery, 1980).

Saponinas. Las saponinas tienen capacidad de causar la lisis de los eritrocitos (Khalil y El-Adawy, 1994) e incrementar la permeabilidad del intestino delgado inhibiendo el transporte activo de nutrientes (Johnson y col., 1986) y, por tanto, pueden interferir en el crecimiento.

Ácido oxálico. El ácido oxálico es un ácido fuerte que forma complejos insolubles con metales divalentes como el calcio, disminuyendo su biodisponibilidad (Gontzea y Sutzescu, 1968). También está implicado en la formación de cálculos renales como consecuencia de la débil disociación de las sales de oxalato cálcico (Streicher, 1964).

Antivitaminas. Los compuestos con carácter antivitaminico son los que disminuyen o destruyen el efecto de las vitaminas de una forma específica, como por ejemplo la ácido ascórbico oxidasa, las antitiaminas y el niacinógeno, para el ácido ascórbico, tiamina y niacina, respectivamente (Partearroyo y col., 1995).

2.1.1.1. Importancia económica y nutricional de guisantes

Los guisantes (*Pisum sativum*) pertenecen a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Vicieae*. Estas semillas siempre han formado parte de la dieta humana y animal, y es una de las leguminosas más importantes en nutrición (Ramos, 1996).

Es una planta anual, trepadora y herbácea, que puede ser enana (15-90 cm), media (90-150 cm) o alta (150-300 cm). Las hojas son compuestas y provistas de zarcillos. Las flores tienen cinco pétalos de color blanco, rosa o azul y las semillas pueden ser lisas o rugosas. Los guisantes de semilla lisa son más tempranos y resistentes, mientras que las variedades rugosas tienen sabor más dulce.

El guisante resiste heladas ligeras y, por tanto, puede sembrarse al principio de la primavera, en cuanto puede trabajarse el suelo.

Durante los últimos 20 años la producción mundial de guisantes se ha incrementado notablemente desde 1000 Kg/ha hasta 1500 Kg/ha. Esto ha hecho que, sin contar con la soja, estén próximos a pasar del 3^{er} al 1^{er} lugar de leguminosas grano en el mundo en cuanto a producción.

Tabla 8. Superficie cultivada y Producción mundial en 1993

Cultivo	Miles de hectáreas	Kg/hectárea	Producción mundial (1000 Toneladas)
Soja	57.385	1.937	111.157
Garbanzos	10.778	697	7.513
Alubias	24.418	654	15.973
Guisantes	8.954	1.659	14.853

Fuente: Ramos (1996)

En la Unión Europea el cultivo del guisante no existía hasta 1978 donde apareció un reglamento comunitario a favor de los guisantes y las habas. Francia es el país comunitario que más superficie dedica a este cultivo, representando las $\frac{3}{4}$ partes del total de la producción. En España, el área de superficie sembrada de guisantes se ha visto incrementada desde 1985 a 2001 de 4.600 ha a 48.700 ha.

Tabla 9. Datos de superficies y producciones en diferentes países

Mundo y principales países	Superficie		Producción	
	Media 1989-91 miles de hectáreas	1999 miles de hectáreas	Media 1989-91 miles de toneladas	1999 miles de toneladas
Mundo	8.749	5.710	14.740	10.936
Unión Europea	963	1.127	5.038	4.636
España	8	43	10	48
Francia	660	476	3.191	2.622
Australia	358	321	393	357
Canadá	164	835	303	2.252

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2002)

En la Tabla 10 se recoge la composición proximal de guisantes. Estas leguminosas son ricas en proteínas, carbohidratos, fibra alimentaria, vitaminas y minerales.

Tabla 10. Valor energético y composición proximal de guisantes

Energía(Kcal)	317Kcal
Proteínas (%)	20-26
Lípidos (%)	1-3
Glúcidos (%)	46-50
Humedad (%)	7-9
Fibra (%)	16,7

Fuente: Martínez y Zulet (1999)

Los guisantes son ricos en proteínas, pero su deficiencia en aminoácidos azufrados, cisteína y metionina (Boulter, 1997) hace que tengan un valor biológico de 64%, cifra inferior a la del alimento de referencia (De Haro, 1983).

El contenido en carbohidratos de los guisantes es bastante elevado, aproximadamente el 60%, siendo el componente mayoritario el almidón (45%). Entre los azúcares solubles totales se encuentran en muy bajas concentraciones los monosacáridos fructosa y glucosa, mientras que el contenido en sacarosa es del 2% y de los α -galactósidos es de 2,3-9,6% (Kozłowska y col., 2001; Vidal-Valverde y col., 2003).

Al igual que el resto de leguminosas, el guisante es rico en fibra alimentaria, aproximadamente un 16%, con mayor contenido de fibra insoluble que soluble (Kmita-Glazewska y Kostyra, 1998).

El contenido lipídico es bajo, oscilando entre un 1-3%. El ácido linoléico es el más abundante (38-50%), seguido del oléico (17-29%), palmítico (14-17%), linolénico (9-10%) y estéarico (3-4%) del total del aporte graso de la semilla (Jones y col., 1992).

Las vitaminas que están en mayor proporción en las leguminosas son las del grupo B: tiamina (0,5-1,10 mg/100g), riboflavina (0,18-0,35 mg/100g) y niacina (1,79-3,20 mg/100g), ácido fólico (59 μ g/100g), así como caroteno (3,16-37,53 μ g/100g) (Kantha y Erdman, 1987).

Por otra parte, el guisante es rico en minerales como fósforo (298 mg/100g), magnesio (124 mg/100g), calcio (75 mg/100g), sodio (20,4 mg/100g) e hierro (5,1 mg/100g) (Salunkhe y Kadam, 1989).

El guisante es una leguminosa que cuando está completamente maduro y seco se transforma en harina y se utiliza en la fabricación de sopas. Cuando está

fresco se utiliza como vegetal nutritivo, enlatándose, congelándose o deshidratándose para su uso alimentario. Recientemente se han desarrollado múltiples usos para la fabricación de pastas (Frías y col., 1997), extracción de aceites (Jones y col., 1995) o la fabricación de plásticos biodegradables (Laguna y col., 1997).

2.1.1.2. Importancia económica y nutricional de lentejas

Las lentejas (*Lens culinaris* o *Lens esculenta*) pertenecen a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae* y tribu *Vicieae*. Son semillas nativas del suroeste de Asia y se han cultivado desde la antigüedad. Es una fuente importante de proteínas para cerca de 10 millones de personas en el área mediterránea, África, Asia y Sudamérica (Savage, 1988).

La lenteja es una planta herbácea anual cuyo tallo pocas veces supera los 50 cm de altura y presenta flores pequeñas con pétalos de color blanco, azul claro o lila dispuestas en pequeños racimos. El fruto es una legumbre que encierra semillas con forma de lente. Las lentejas tienen una alta variabilidad genética y en general están bien adaptadas a diversas condiciones climáticas, aunque normalmente se cultivan en zonas templadas después de las lluvias otoñales.

El cultivo de lentejas en Europa queda prácticamente limitado a la región Mediterránea, destacando sobre todo España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2002), pero paradójicamente en nuestro país no solo la exportación en los últimos años ha sido muy pequeña (26.600 ha en 2001), sino que además se ha convertido en un importador de lenteja, procedente principalmente de Turquía y Canadá (Tabla 11).

Tabla 11. Datos de superficies y producciones en diferentes países

Mundo y principales países	Superficie		Producción	
	Media 1989-91 miles de hectáreas	1999 miles de hectáreas	Media 1989-91 miles de toneladas	1999 miles de toneladas
Mundo	3.228	3.211	2.426	2.919
Unión Europea	50	29	69	18
España	44	21	26	9
Turquía	858	400	669	586
Canadá	158	497	217	724
Estados Unidos	43	71	57	108

Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2002)

En la Tabla 12 se recoge la composición proximal de lentejas. Estas leguminosas son ricas en proteínas, carbohidratos, fibra alimentaria, vitaminas y minerales.

Tabla 12. Valor energético y composición proximal de lentejas

Energía(Kcal)	314Kcal
Proteínas (%)	20-28
Lípidos (%)	1-3
Glúcidos (%)	50-58
Humedad (%)	7-9
Fibra (%)	11,7

Fuente: Martínez y Zulet (1999)

En las lentejas el contenido en proteína oscila entre un 20-28% y, al igual que en guisantes, son deficitarias en aminoácidos azufrados, cisteína y metionina, presentando un valor biológico de un 55% (Khan y col., 1979).

El contenido en carbohidratos es similar al de los guisantes, entre un 50-58%, donde el almidón representa el porcentaje más alto, 40-55%. Entre los carbohidratos solubles totales se encuentran los monosacáridos fructosa y glucosa en cantidades traza y el disacárido sacarosa con un 1,7%. Los α -galactósidos son los azúcares solubles mayoritarios en la semilla con un 3,2%, entre el que se encuentra el trisacárido ciceritol (Quemener y col., 1983; Vidal-Valverde y col., 1992b, 1993a,b; Frías y col., 1994a,b; 1995, 1996a,d,e; Urbano y col., 1995; Sotomayor, 1997).

El contenido en fibra alimentaria es elevado (11,7-21%) (Savage, 1988). El contenido de fibra insoluble oscila entre 9-13%, y el de fibra soluble entre 1-4%.

El contenido en lípidos es bajo (1-3%) siendo los ácidos grasos oléico y linoléico los mayoritarios.

Las vitaminas que en mayor contenido se encuentran en las lentejas son las del grupo B: tiamina (0,45 mg/100g), riboflavina (0,20 mg/100g) y niacina (2,6 mg/100g). Contiene además UI de β -caroteno (Savage, 1988).

Las lentejas son una buena fuente de minerales, principalmente fósforo (293 mg/100g), magnesio (94 mg/100g), calcio (69 mg/100g), sodio (0,44 mg/100g) e hierro (4,8 mg/100g) (Salunkhe y Kadam, 1989).

Las lentejas, al tener una excelente calidad nutricional permite una gran variedad de preparaciones culinarias. Se pueden consumir cocidas, germinadas o fermentadas. Su harina es a menudo utilizada mezclada con harina de cereales en

la industria panaria. A veces se emplea como fuente de almidón comercial para su uso en industrias textiles y de impresión (Alonso y Cristobal, 1998).

2.1.1.3. Importancia económica y nutricional de judías

Las judías mayoritariamente pertenecen al género *Phaseolus* aunque también se incluyen otros géneros como *Vigna*. Pertenecen a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae* y tribu *Phaseoleae*. Son una de las leguminosas alimenticias más extensamente cultivadas y utilizadas y la más importante en el oeste de África y Sudamérica (Doughty y Walker, 1982, Phillips y McWatters, 1991; Leterme y Muñoz, 2002).

Es una planta herbácea anual con tallos delgados, retorcidos, redondeados, nerviados, rugosos o lisos. La inflorescencia es un racimo axilar con un pedúnculo alargado de 5-60 cm. Las hojas son alternas, trifoliadas y algo peludas. Las vainas de las semillas son finas y pueden variar mucho en tamaño, forma, color y textura. Exigen un suelo rico, ligero y cálido y se siembran en primavera, cuando ya ha pasado el riesgo de heladas, pues no toleran las temperaturas bajas ni el encharcamiento del terreno.

De las variedades que se consumen maduras se aprovecha sólo las semillas. El frijol de ojo negro o cowpea (*Vigna sinensis*) tiene su origen en África o Asia y, en general, está bien distribuida por los trópicos y subtrópicos. En África son las leguminosas preferidas, constituyendo uno de los alimentos básicos y son apreciados por todos los grupos sociales, formando parte de numerosos platos, consumiéndose tres formas básicas, aunque hay muchas variaciones locales. La región de la sabana del oeste de África produce alrededor del 95% de la cosecha mundial, con Nigeria como país más importante (Ramos, 1996).

Tabla 13. Datos de superficies y producciones en diferentes países

Mundo y principales países	Superficie (hectáreas)	Producción (Toneladas)
Mundo	9.183.799	3.512.942
Europa	11.700	34.400
África	8.890.609	3.270.045
Nigeria	5135	2.172
Asia	218.970	164.900
Estados unidos	5.050	4500
Latinoamérica	50.470	36.097

FAO (2001)

En la Tabla 14 se recoge la composición proximal de judías. Estas leguminosas son ricas en proteínas, carbohidratos, fibra alimentaria, vitaminas y minerales.

Tabla 14. Valor energético y composición proximal de judías

Energía(Kcal)	340Kcal
Proteínas (%)	18-35
Lípidos (%)	0,7-3,5
Glúcidos (%)	56-68
Humedad (%)	8-12
Fibra (%)	27

Fuente: Prinyawiwatkul y col. (1996); Phillips y McWatters. (1991)

Esta leguminosa constituye una fuente importante de proteínas (18-35%), de las cuales entre un 3-15% lo constituyen las albúminas y un 48-90% las

globulinas. Al igual que el resto de leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados pero ricas en lisina, lo que hace muy recomendable su suplementación con cereales.

El contenido en carbohidratos oscila entre un 56-68%, y el componente más importante es el almidón (40%) (Prinyawiwatkul y col., 1996). De los azúcares solubles, el contenido en sacarosa oscila entre un 1,8-3,1%, y los oligosacáridos α -galactósidos constituyen cerca del 5%.

El contenido en fibra, como en el resto de leguminosas, es elevado (27%), donde la fracción de fibra soluble representa un 8-10% y la de fibra insoluble un 9-12%, lo que le confiere propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas, pudiendo reducir el riesgo de cáncer de colon (Anderson y Tietyen-Clark, 1986; Hughes, 1991).

El contenido lipídico que aportan las judías es bajo (1-3%), siendo los ácidos grasos insaturados más representativos el oléico (7-10%), linoléico (21-28%) y linolénico (35-54%).

El aporte vitamínico de las judías viene preferentemente representado por las vitaminas del grupo B: tiamina (0,54 mg/100g), riboflavina (0,20 mg/100g) y niacina (2,1 mg/100g). El contenido de β -caroteno es bajo y presenta también un escaso contenido en vitamina C.

El contenido mineral viene representado mayoritariamente por el potasio (1150 mg/100g), fósforo (70-324 mg/100g), magnesio (230 mg/100g) y calcio (70-324 mg/100g) y en menor medida por hierro y zinc.

Las judías se pueden comercializar secas en distintos envases de plástico, o bien enlatadas o cocidas, más o menos condimentadas, precocinadas y deshidratadas, congeladas, germinadas y fermentadas para diferentes procesos culinarios, o en forma de harina para la elaboración de distintos productos

alimenticios. En la India se utiliza en forma de dhal o en África se vaporizan para dar lugar al moin-moin (Salunkhe y Kadam, 1989).

2.2. Procesos oxidativos y capacidad antioxidante de alimentos

Los organismos aerobios utilizan un catabolismo oxidativo como método más efectivo para obtener energía de los nutrientes de los alimentos. Durante este proceso se generan continuamente radicales libres altamente reactivos. Los radicales libres son especies que contienen electrones desapareados y que son capaces de tener existencia independiente (Lindsay and Astley, 2002). El término estrés oxidativo indica que el status antioxidante de las células y tejidos está alterado debido a la presencia excesiva de agentes oxidantes, es decir, que no existe un balance entre la producción de radicales y el sistema de defensa antioxidante, produciéndose efectos destructivos y letales en la célula originando, por último, diferentes patologías como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Madhavi y col., 1996).

En la Tabla 15 se recoge la clasificación de especies reactivas de oxígeno, cloro y nitrógeno:

Tabla 15. Clasificación de especies reactivas de oxígeno, cloro y nitrógeno

Especies reactivas de Oxígeno (ROS)	
Radicales	No Radicales
Superóxido $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno H_2O_2
Hidroxilo OH^{\bullet}	Ácido Hipobromoso $HOBr$
Hidroperoxilo HO_2^{\bullet}	Ozono O_3
Peroxilo RO_2^{\bullet}	Oxígeno singlete $^1\Delta^1 O_2$
Peroxilo de lípido LO_2^{\bullet}	Peróxidos de lípidos $LOOH$
Alcohoxilo de lípido LO^{\bullet}	Productos de la reacción de Maillard
Especies Reactivas de Cloro (RCS)	
Radicales	No Radicales
Cloro atómico Cl^{\bullet}	Ácido hipocloroso $HOCl$
	Cloruro de nitrilo NO_2Cl
	Cloraminas
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Radicales	No Radicales
Óxido nítrico NO^{\bullet}	Ácido nitroso HNO_2
Dióxido de nitrógeno NO_2^{\bullet}	Catión nitrosilo NO^+
	Anión nitrosilo NO^-
	Tetróxido dinitrógeno N_2O_4
	Trióxido dinitrógeno N_2O_3
	Peroxinitrito $ONOO^-$
	Ácido peroxinitroso $ONOOH$
	Catión nitronium NO_2^+
	Peroxinitritos de alquilo $ROONO$
	Cloruro de nitrilo NO_2Cl
	Cloruro de nitrilo NO_2Cl

Los centros diana de estos radicales son:

Carbohidratos. Los radicales hidroxilos reaccionan con los carbohidratos secuestrando al azar un hidrógeno de un átomo de carbono, produciendo un radical carbono que ocasionaría la ruptura de importantes moléculas tales como el ácido hialurónico (Cadenas y Packer, 2002).

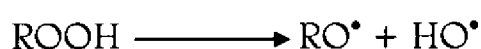
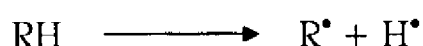
Ácidos nucleicos. La intensidad del daño que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ocasionar al ADN difiere dependiendo de la localización de éste. El ADN en la mitocondria está muy expuesto al daño oxidativo debido a que no dispone de proteínas protectoras, como sucede con el ADN nuclear. Los ROS podrían alterar las enzimas que participan en los procesos de replicación, transcripción o regulación de la expresión génica (Cadenas y Packer, 2002).

Proteínas. Las proteínas poseen muchos puntos reactivos que pueden dañarse por el estrés oxidativo. Se pueden producir por radicales hidroxilo fragmentaciones de proteínas que poseen aminoácidos de prolina e histidina, oxidaciones de proteína que tienen enlaces de unión con metales u oxidación de grupos sulfhidrilos de cisteína (Cadenas y Packer, 2002).

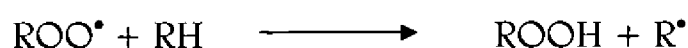
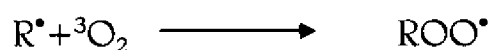
Lípidos. El ataque del oxígeno sobre los lípidos se ve favorecido por la insaturación de los ácidos grasos. Ello da lugar a cambios químicos complejos que en el ser vivo pueden originar un gran número de patologías, y en los alimentos pueden acortar su vida útil produciendo fenómenos de rancidez y otros tipos de sabores y olores indeseados (Cadenas y Packer, 2002).

Mecanismo de oxidación lipídica. En los alimentos la reacción directa de una molécula lipídica con una molécula de oxígeno (autooxidación) tiene tres fases bien diferenciadas: fase inicial, fase de propagación y fase de terminación.

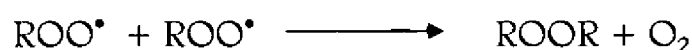
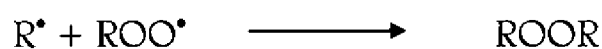
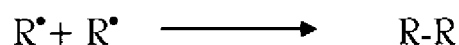
1) *Fase inicial*: Se inicia por la formación de un radical libre, normalmente mediado por la presencia de metales traza, irradiación, luz o calor. Los radicales libres se originan cuando el oxígeno entra en contacto con un lípido insaturado. También se produce la formación de radicales alcohilo (RO^\bullet) por división homolítica de los hidroperóxidos lipídicos o por descomposición bimolecular.



2) *Fase de propagación*: Los radicales libres formados se convierten en otros radicales por reacción con una molécula de oxígeno en su estado triplete, dando lugar a un radical peroxilo ROO^\bullet , o por la sustracción de un átomo de hidrógeno a una molécula lipídica produciendo la formación de peróxidos (ROOH) que a su vez favorecen las reacciones de iniciación.



3) *Fase de terminación*: Los radicales libres originados en las fases anteriores tienden a reaccionar entre sí para formar compuestos no radicales estables. De esta manera las reacciones de terminación interrumpen la secuencia repetitiva de la etapa de propagación de la cadena (Madhavi y col., 1996).



En condiciones normales el organismo cuenta con un complejo sistema capaz de prevenir o retardar los procesos de oxidación. De forma general los sistemas de defensa se resumen en:

- ♦ Sistema de defensa primario, cuya función es inactivar los radicales libres antes de iniciarse las reacciones de peroxidación. Aquí se encuentran englobados los sistemas enzimáticos superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa, junto con proteínas secuestrantes de iones metálicos.
- ♦ Sistema de defensa secundario, que atrapa a los radicales libres ya formados una vez iniciada la reacción de peroxidación en cadena, y aquí se encuentran los antioxidantes de la dieta, como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, glutathion, polifenoles, etc.
- ♦ Sistema de defensa terciario o sistema reparador, constituido por enzimas reparadoras de los daños ocasionados a proteínas y ADN.

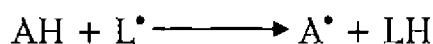
Antioxidantes. Un antioxidante es cualquier sustancia que en concentraciones pequeñas, comparadas con la del sustrato oxidable, retrasa significativamente o evita la oxidación de dicho sustrato. Casi todo lo que se encuentra en los alimentos y en los tejidos biológicos, excepto el agua, es susceptible de ser oxidado. El sustrato oxidable puede estar constituido por proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Los antioxidantes son sustancias químicas que son capaces de donar un átomo de hidrógeno y reducir los radicales primarios a especies químicas no reactivas. La estructura molecular de un antioxidante permite donar átomos de hidrógeno, así como formar radicales con baja reactividad y sin posibilidad de reacción con lípidos (Cadenas y Packer, 2002).

Los antioxidantes se pueden clasificar en antioxidantes primarios, secundarios, sinérgicos y misceláneos.

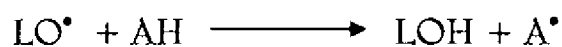
Antioxidantes primarios (AH). Son los que actúan rompiendo la cadena de oxidación mediante la donación de hidrógenos o electrones convirtiendo los radicales libres en productos estables. Estos antioxidantes son efectivos a muy bajas concentraciones, sin embargo pueden llegar a ser pro-oxidantes a altas concentraciones. Dentro de este grupo podemos encontrar a los compuestos fenólicos (galatos), fenoles impedidos (butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT)) y tocoferoles (Cadenas y Packer, 2002).

Los antioxidantes primarios pueden retardar o inhibir la oxidación mediante los siguientes mecanismos:

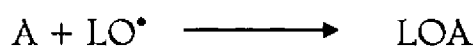
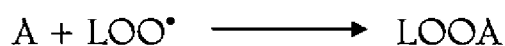
- a) Reaccionando con una radical libre del lípido directamente



- b) Evitando la propagación de la oxidación reaccionando con los radicales peroxilo y alcoxilo de los lípidos



Los radicales libres del antioxidante reaccionan con grupos peroxilos y alcoxilos de la cadena de oxidación formando los compuestos peroxi de los antioxidantes (Antolovich y col., 2002).



Antioxidantes secundarios o preventivos. Estos compuestos retardan la velocidad de oxidación. Existen diferentes mecanismos, entre ellos la eliminación del sustrato,

el secuestro del oxígeno singlete, la descomposición de los peróxidos de lípidos en productos más estables, etc. Entre estos tipos de antioxidantes se encuentran el ácido tiodipropiónico, los ésteres de dilauril o diesteárico, etc.

Antioxidantes sinérgicos. Estos antioxidantes son secuestradores de oxígeno y quelantes. Actúan como donantes de hidrógeno a radicales fenoxilos regenerando así los antioxidantes primarios. Actúan en medio ácido confiriendo estabilidad a dichos antioxidantes primarios. La presencia de antioxidantes sinérgicos permite que los antioxidantes fenólicos sean utilizados en muy bajas concentraciones.

Los secuestradores de oxígeno como el ácido ascórbico, ascorbil palmitato, sulfitos y eritorbatos (ácido isoascórbico) reaccionan con el oxígeno libre eliminándolo en un sistema cerrado. El ácido ascórbico reacciona directamente con el oxígeno para formar el ácido dehidroascórbico. El ácido ascórbico y el ascorbil palmitato actúan como antioxidantes sinérgicos con antioxidantes primarios, especialmente con los tocoferoles.

Los quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético, el ácido cítrico y los fosfatos no son antioxidantes propiamente dichos, pero sí ejercen una acción sinérgica sobre los primarios y los secuestradores de oxígeno. Actúan quelando a los metales pro-oxidantes como el hierro y el cobre formando complejos estables y evitando las reacciones de iniciación de la peroxidación.

Antioxidantes misceláneos. Se trata de antioxidantes que actúan de forma muy diversa como por ejemplo aminoácidos, flavonoides y compuestos relacionados que se comportan como antioxidantes primarios y sinérgicos a la vez, el β -caroteno y otros carotenoides que inactivan el oxígeno singlete y previenen la formación de hidroperóxidos, el zinc que inhibe fuertemente la peroxidación lipídica a nivel de membrana (alterando o evitando la unión del hierro), el selenio necesario para la síntesis y actividad de la glutathion peroxidasa (enzima celular antioxidante) y las enzimas glucosa oxidasa y catalasa que eliminan el oxígeno disuelto y previenen la

acumulación del peróxido de hidrógeno, respectivamente (Cadenas y Packer, 2002).

Los antioxidantes en los alimentos son interesantes por 3 razones:

1) Protección del alimento frente al daño oxidativo.- Los antioxidantes endógenos y exógenos pueden prevenir frente al daño oxidativo. La mayoría son fenoles que actúan rompiendo la cadena de oxidación debido a que su grupo hidroxilo atrapa a los radicales reactivos tales como el RO_2^{\bullet} originado el radical RO^{\bullet} con menor reactividad debido a que su electrón se encuentra en el anillo aromático. También los fenoles son capaces de quelar a los metales.

2) Efectos beneficiosos al ser absorbidos a nivel intestinal.- Especialmente por parte de los tocoferoles y vitamina C. Se ha establecido un mecanismo específico de salida para el L-ascorbato en el tracto gastrointestinal. Los tocoferoles absorbidos en la dieta son segregados de forma selectiva por el hígado al plasma.

3) Efectos beneficiosos a nivel gastrointestinal sin ser absorbidos, como por ejemplo los nitritos presentes en los alimentos y en la saliva pueden tener efectos positivos y negativos. El óxido de nitrógeno inhibe la peroxidación lipídica por al menos dos mecanismos: a) captando los radicales peroxilo reactivos o cortando la cadena de propagación y b) liberando iones hierro y compuestos con grupo hemo, como la mioglobina.

Entre los antioxidantes más importantes en los alimentos se encuentran la vitamina E, vitamina C, carotenoides, flavonoides, glutatión y selenio:

Vitamina E. Como vitamina E se engloba a un grupo de compuestos de naturaleza liposoluble que incluye los tocoferoles y tocotrienoles con sus respectivos isómeros α -, β -, γ - y δ - (ver apartado 2.1.). La actividad antioxidante

de los componentes de la vitamina E se debe a su capacidad para inactivar a los radicales libres y detener las reacciones en cadena de propagación iniciadas durante la peroxidación lipídica. La vitamina E es muy efectiva para proteger a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) formadores de las membranas, que tienen importantes funciones estructurales y de membrana, durante los estadíos iniciales del ataque de los radicales libres. De este modo minimiza el daño causado por las ROS asociados al cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro (Madhavi y col., 1996; Garewal, 1997; Cascales, 1999; Eitenmiller y Landen, 1999; Pokorny y col., 2001; Cadenas y Packer, 2002).

Vitamina C. Como vitamina C se incluyen todos los compuestos que presentan la actividad biológica del ácido L-ascórbico (ver apartado 2.1.). Es el antioxidante hidrosoluble más potente de los alimentos debido a su estructura, que le permite donar fácilmente electrones convirtiéndose en ácido dehidroascórbico, forma oxidada del ácido ascórbico, manteniendo un equilibrio de óxido-reducción entre ambas formas. El oxígeno molecular, los radicales superóxido e hidroxilo y el ácido hipocloroso pueden ser neutralizados por el ácido ascórbico transformándose en dehidroascórbico. Además, juega un papel muy importante regenerando α -tocoferol a partir de tocoferol oxidado en las membranas celulares. La interacción entre α -tocoferol y ácido ascórbico mueve los radicales libres de la fase lipídica a la fase acuosa, previniendo la peroxidación de las LDL. De este modo protege a los lípidos frente a la oxidación *in vitro* e *in vivo*, ejerce efectos beneficiosos sobre la vasodilatación en pacientes con enfermedades cardiovasculares o reduce el riesgo de padecer cáncer (Madhavi y col., 1996; Garewal, 1997; Cascales, 1999; Eitenmiller y Landen, 1999; Pokorny y col., 2001; Cadenas y Packer, 2002).

Carotenoides. Los carotenoides son un conjunto de compuestos químicos que se caracterizan por tener una cadena poliisoprenoide de 40 átomos de carbono entre los que se encuentran una serie de dobles enlaces en la posición central de la molécula (ver apartado 2.1.1.). El efecto antioxidante de los carotenoides se debe,

principalmente, a estos dobles enlaces, que le permite tener electrones deslocalizados y cederlos con facilidad a otras moléculas reactivas, neutralizándolas. Los carotenoides actúan principalmente en tejidos externos directamente expuestos al oxígeno atmosférico y a la radiación solar, como la piel y los ojos. El oxígeno atmosférico se puede transformar en oxígeno singlete por contacto con cualquier agente sensibilizante, como la radiación ultravioleta, y este oxígeno singlete puede a su vez generar más radicales libres. Los carotenoides, al ser sustancias coloreadas que absorben la radiación solar, neutralizan a especies reactivas en tejidos externos del organismo, especialmente del oxígeno singlete y el radical peroxilo impidiendo su daño oxidativo en los PUFA, proteínas o ADN (Madhavi y col., 1996; Garewal, 1997; Cascales, 1999; Eitenmiller y Landen, 1999; Pokorny y col., 2001; Cadenas y Packer, 2002).

Flavonoides. Los flavonoides son los compuestos fenólicos con más potente actividad antioxidante. Se caracterizan por tener un anillo aromático A, un heterociclo C, y otro anillo aromático B y una distribución de dobles enlaces y grupos hidroxilo en los distintos anillos de la molécula. Los flavonoides comprenden 6 grandes grupos de compuestos en función de los radicales situados en las diferentes posiciones del anillo, y son flavonas, flavonoles, flavononas, catequinas, antocianidinas e isoflavonas. Son capaces de donar protones a los radicales libres, principalmente radicales peroxilo, y facilitar la deslocalización de los electrones, debido a los dobles enlaces conjugados, dando gran estabilidad al radical fenoxilo formado. La eficacia antioxidante depende del grado de hidroxilación en el anillo aromático, siendo menor en presencia de azúcares glicosilados. Su estructura química y solubilidad les hace ser de naturaleza hidrofílica y lipofílica por lo que se localizan en la interfase lípido-agua de las membranas celulares, y son capaces de secuestrar radicales libres, especialmente peroxilo, proteger a la vitamina E y carotenoides presentes en las LDL de la oxidación, porque se oxidan ellos en primer lugar, regenerar el tocoferol a partir de

tocoferol oxidado, y quelar iones metálicos, que son una de las fuentes del origen de radicales libres (Madhavi y col., 1996; Garewal, 1997; Cascales, 1999; Eitenmiller y Landen, 1999; Pokorny y col., 2001; Cadenas y Packer, 2002).

Glutation. El glutathione es un tripéptido formado por glicina, ácido glutámico y cisteína. Se le considera el antioxidante biológico más importante y también está implicado en multitud de funciones biológicas como el transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, mantenimiento de las formas activas de algunas enzimas o el mantenimiento de las membranas celulares (Reichard y col., 1981; Meister, 1991). La parte funcional reductora del glutathione es el grupo tiol de la cisteína. Actúa como agente reductor gracias a la reactividad del grupo amino libre en el carbono α que reparte la densidad electrónica entre los dobles enlaces de los carbonilos adyacentes. Así puede ser oxidado a disulfuro en presencia de otra molécula de glutathione, actuando como un potente antioxidante (Cadenas y Packer, 2002). Juega un papel importante en la protección de las células contra los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno como un antioxidante independiente de enzimas, donando un hidrógeno, o puede actuar como sustrato del sistema enzimático glutathione peroxidasa-glutathione reductasa. La glutathione peroxidasa contiene selenio y elimina el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por oxidación del glutathione. Este peróxido de hidrógeno es producido en el citosol por la superóxido dismutasa (cobre y zinc) y en la mitocondria por la manganeso superóxido dismutasa mediante un mecanismo de dismutación a partir del anión superóxido.

Posteriormente, y por acción de la glutathione reductasa y en presencia de NADPH, el glutathione oxidado se reduce. La mayor parte del glutathione en la célula se encuentra en estado reducido y solo se acumula como glutathione oxidado bajo condiciones de oxidación o estrés oxidativo.

Selenio. El selenio no se puede considerar un antioxidante como tal de acuerdo a la definición de “compuesto capaz de secuestrar radicales libres”, ni tampoco en el sentido de “crear un ambiente reductor en los sistemas biológicos”. Es un elemento químico situado en el grupo VI de la tabla periódica y cede electrones con facilidad, lo que le confiere un gran poder de óxido-reducción. Forma parte como cofactor de enzimas con importantes funciones bioquímicas como las glutathion peroxidases, las tioredoxinreductasas y peroxidases W y P. Se ha relacionado al selenio con la prevención de ciertas cardiovasculares, enfermedades degenerativas o cáncer (Madhavi y col., 1996; Garewal, 1997; Cascales, 1999; Eitenmiller y Landen, 1999; Pokorny y col., 2001; Cadenas y Packer, 2002).

2.3. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales podrían definirse como “cualquier alimento que además de ejercer unos efectos nutricionales adecuados, quede claramente demostrado que afecta beneficiosamente a una o más funciones en el organismo de forma que, o bien beneficia al estado del bienestar o reduce los riesgos de incidencias de determinadas enfermedades” (Diplock y col., 1999). Para obtener estos efectos es preciso integrarlos en la dieta habitual, pues no se trata de drogas o suplementos dietéticos.

Inicialmente los alimentos funcionales se consideraron como una curiosidad pasajera, pero actualmente son de gran importancia teniendo en cuenta el incremento del coste de la salud pública, el incremento de la expectativa de vida y la demanda por mejorar la calidad de vida especialmente en la tercera edad. Es conocido que la prevención de enfermedades a través de la dieta es una opción para conseguir una vida sana, porque se está demostrando científicamente que la alimentación desempeña un papel preventivo en la lucha de las enfermedades crónicas, y existe gran interés por parte del consumidor en la relación dieta-salud.

Además, la desconfianza hacia los alimentos “procesados” y el interés por los alimentos “naturales” ha hecho a la comunidad científica adquirir un papel importante en la investigación de estos productos (Arai, 2002).

Aunque en Europa y buena parte del mundo la idea de alimento funcional es bastante reciente (década de los 90), en los países orientales esta idea fue concebida a comienzos del siglo XX. Un antiguo proverbio chino dice que la medicina (salud) y la alimentación van íntimamente unidas. Pero no fue hasta la década de los ochenta donde la idea fue desarrollada en Japón y en 1984 se utilizó la terminología de “alimento funcional” por primera vez (Arai, 2002). Así, mientras que los japoneses llevan décadas consumiendo estos productos e interesándose por la prevención sanitaria a través de la alimentación, los consumidores europeos apenas si comienzan a acostumbrarse a este novedoso tipo de comida, ya que no se alcanzó el primer consenso sobre alimentos funcionales hasta 1999, coordinado por el Instituto para las Ciencias de la Vida Europeo (ILSI). El Código Alimentario FAO/OMS de las Naciones Unidas, el Consejo de Europa y las entidades nacionales de regulación están redactando una normativa sobre alimentos funcionales, por la que se podrán difundir únicamente las propiedades “verificables y probadas”. Según esta normativa, cualquier información relativa al carácter beneficioso para la salud indicada en las etiquetas de los productos alimenticios no deberá inducir a engaño y habrá de basarse en pruebas científicas fiables. Lo idóneo sería demostrar que la sustancia en cuestión es absorbida o llega efectivamente al punto donde ha de actuar. Debería probarse que la ingesta de dicho alimento en cantidades normales tiene un efecto fisiológico provechoso. Los alimentos funcionales son susceptibles de mejorar la salud, pero hay que valorarlos en su justa medida y disfrutar de ellos sabiendo que, si bien no son la panacea de todos los males, resultan beneficiosos y aportan un complemento saludable a una dieta apropiada y a un estilo de vida activo.

Según Martín-Hernández y Cámara (2000), de forma general un alimento puede hacerse funcional de las siguientes formas:

- ♦ Mediante la eliminación de compuestos indeseables presentes en el alimento.
- ♦ Incrementando el contenido de un determinado compuesto natural hasta que alcance una concentración adecuada para que ejerza efectos beneficiosos para la salud del individuo.
- ♦ Mediante la adición de determinados compuestos que no se encuentran normalmente en el alimento, y que se ha demostrado su efecto positivo.
- ♦ Sustituyendo un macronutriente que se encuentra en concentración excesiva en el alimento y que produce efectos negativos por otro que ejerce efectos positivos.
- ♦ Mejorando la biodisponibilidad de compuestos que son beneficiosos para la salud.

La funcionalidad de las leguminosas se puede obtener mediante la eliminación total o parcial de los compuestos de carácter antinutritivo, bien aumentando la biodisponibilidad de determinados nutrientes o bien incrementando determinados compuestos bioactivos que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud, obteniendo de este modo alimentos funcionales de indudable interés nutricional y fisiológico.

2.3.1. Procesos tecnológicos para la obtención de harinas funcionales de leguminosas

Los procesos tecnológicos más utilizados por diversos autores con objeto de reducir los factores antinutritivos y, de esta manera, aumentar el valor nutricional

de las leguminosas son remojo, cocción, germinación, fermentación y adición de enzimas específicas (Vidal-Valverde y col. 1993a,b, 1994; Tabera y col. 1995; Van Hartingsveldt y col. 1995; Frías y col. 1996b,e, 2000).

Proceso de remojo. El proceso de remojo, tanto en agua como en soluciones salinas, es una técnica muy antigua y efectiva para reducir o eliminar el contenido de factores antinutritivos solubles como α -galactósidos (Vidal-Valverde y col., 1992b), ácido fítico (Vidal-Valverde y col., 1998), taninos (Barampana y Simard, 1994) e inhibidores de tripsina (Márquez y Alonso, 1999), pero a la vez también se pierden nutrientes solubles como vitaminas (Prodanov, 1996). Normalmente se utiliza el remojo como un paso previo a otro tratamiento, como por ejemplo la cocción, con el fin de ablandar la semilla y facilitar su cocinado. El grado de hidratación va a depender de muchos factores, entre ellos la especie y variedad de leguminosa, el tiempo y temperatura de remojo, proporción semillas-líquido, o la presencia o ausencia de sales en el agua de remojo.

Proceso térmico. La cocción es el proceso térmico más común, y es utilizado para inactivar factores antinutritivos termolábiles como los inhibidores de tripsina (Vidal-Valverde, 1993b; Alonso y col., 2000), mejorando la digestibilidad proteica, ya que el calor produce modificaciones en la conformación y estructura de las proteínas lo que favorece el ataque enzimático (Periago y col., 1997). Además, reduce en gran medida el contenido en α -galactósidos (Frías y col., 2000), ácido fítico (Habiba, 2002) y taninos (Ibrahim y col., 2002). Otro proceso térmico también empleado con éxito es la aplicación de calor seco o autoclave que prácticamente elimina la presencia de los inhibidores de tripsina en las leguminosas (Di Pietro y Liener, 1989; Vidal-Valverde, 1998).

Proceso de germinación. El proceso de germinación es una técnica muy efectiva y económica para mejorar la calidad de las leguminosas aumentando su digestibilidad proteica (Vanderstoep, 1981; Bau y col., 2000) y reduciendo los

factores antinutritivos (Ghorpade y Kadam, 1989; Frías y col., 1995, Vidal-Valverde y col., 2002). Durante este proceso se produce la movilización de los nutrientes de reserva necesarios para el desarrollo de la semilla. Desciende los niveles de hemaglutininas y taninos (El-Mahdy y col., 1985) y el contenido en inhibidor de tripsina (Frías y col., 1995). Durante la germinación también se reducen los niveles de ácido fítico por la activación de las enzimas fitasas presentes en la semilla, mejorando la biodisponibilidad mineral (Honke y col., 1998). De igual forma y por la activación de las α -galactosidasas endógenas se produce la reducción del contenido de α -galactósidos (Frías y col., 1996b), dando lugar a la energía necesaria para el desarrollo de la planta durante este proceso.

Proceso de adición de enzimas. La adición de enzimas a los alimentos actualmente está adquiriendo un gran auge debido, principalmente, a las mejoras biotecnológicas, que permiten actuar sobre determinados constituyentes sin detrimento de la calidad del resto de los nutrientes (Van Hartingsveldt y col., 1995).

Las enzimas son sustancias naturales producidas por todas las células vivas de plantas, animales o microorganismos. Se trata de proteínas de alto peso molecular que a veces pueden contener partes no proteicas como carbohidratos, lípidos, grupos fosfato o metales (The Association of Microbial Food Enzymes Producers, 1992). Actúan como catalizadores biológicos para acelerar las reacciones químicas. Son específicas, efectivas a bajas concentraciones y dependientes de la temperatura y el pH (James y Simpson, 1996). El éxito de la actuación enzimática va a depender de las reacciones bioquímicas que se desencadenan durante su actuación. Por ello, el sustrato debe estar perfectamente identificado y caracterizado, y la reacción se debe llevar a cabo en las condiciones catalíticas idóneas (pH, temperatura, tiempo, etc).

La aplicación de enzimas microbianos en la industria alimentaria tuvo sus orígenes en Asia, mientras que en Norte América y en Europa Occidental fue más común el uso de enzimas procedentes de plantas y animales (James y Simpson, 1996). Al principio, la aplicación de estas enzimas era bastante inespecífica puesto que no se tenía un buen conocimiento ni de la enzima en sí, ni del sustrato sobre el que actuaría. En 1911 ya se utilizaba la papaína en la estabilización de la cerveza y en los años 30 las pectinasas para la clarificación de los zumos de frutas.

La utilización de enzimas es de notable relevancia en nutrición animal, donde se ha usado y se usa en la dieta de los pollos o cerdos (van Lookeren y Kies, 1995) y puede ser una técnica muy útil para la mejora del valor nutritivo de leguminosas de consumo humano, ya que lograría reducir o eliminar totalmente determinados factores antinutritivos. Así, varios autores han observado que con la adición selectiva de varias enzimas a las leguminosas disminuyen los niveles de α -galactósidos (Mulimani y col., 1997), ácido fítico (Konietzny y Greiner, 2002) o taninos (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001).

La aplicación del enzima en el alimento después de la molienda es una forma alternativa que está bien adaptada para el procesado de alimentos como por ejemplo la soja (Classen y col., 1988) y que podría ser aplicada a otras leguminosas como guisantes y lentejas objeto de estudio en este trabajo.

En la Unión Europea, todas las enzimas utilizadas en la industria alimentaria han de estar bien clasificadas y sus mecanismos de actuación perfectamente definidos siguiendo determinadas pautas regidas por la Ley. Según Rijke, (1995) los requerimientos principales son:

- ♦ Identificación y especificaciones, así como el método de obtención
- ♦ Propiedades y estabilidad

- Condiciones de uso
- Métodos de control
- Eficacia de la preparación enzimática
- Seguridad de la preparación enzimática

Las enzimas están incluidas en el grupo de aditivos alimentarios. Este aditivo alimentario necesita de la demostración tecnológica de que efectivamente el efecto enzimático sobre el componente alimentario se ha producido (Tournut, 1995).

Algunas de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria como coadyuvante tecnológico con objeto de aumentar el valor biológico de determinados alimentos son:

Tanases. Son enzimas que hidrolizan las uniones épsido y éster de los taninos hidrolizables liberando ácido gálico y glucosa (Haworth y col., 1958). Es una enzima inducible, elaborada por numerosos microorganismos, que se segrega solo en presencia de taninos gálicos, ácido gálico o sus ésteres (Jean y col., 1978).

Los taninos son potentes inhibidores de la absorción de hierro (Brune y col., 1989) e incluso de la actividad fitásica sobre otros compuestos (Svanberg y col., 1993) con capacidad para precipitar proteínas formando complejos insolubles durante la digestión e impidiendo su asimilación (Jansmann, 1993). La tanasa se utiliza en distintas industrias alimentarias como son las de manufacturación del té instantáneo o la de aditivos con aroma de café para bebidas refrescantes (Chae y Yu, 1983; Pourrat y col., 1985). También presenta un uso potencial en la clarificación de la cerveza y zumos de frutas (Cantarelli y col., 1989)

Enzimas que actúan sobre polisacáridos no almidónicos. Los polisacáridos no almidónicos se encuentran en la pared celular de los vegetales y, por tanto, pueden limitar el acceso de enzimas endógenas a los nutrientes, reduciendo su utilización. El empleo de complejos multienzimáticos formado por mezclas de celulasas, arabinasas, hemicelulasas y xilanasas de origen microbiano, se utilizan para la ruptura de las paredes celulares y favorecer la liberación de nutrientes aumentando su digestibilidad y absorción (Bedford y Classen, 1992).

α -galactosidasa. Esta enzima es la responsable de la hidrólisis de los α -galactósidos ya que es una enzima que hidroliza los enlaces glicosídicos en las posiciones α -(1,6) entre moléculas de galactosa. La α -1,6-galactosidasa está presente en un amplio rango de plantas y microorganismos (Dey y Pridham, 1972; Somiari y Balogh, 1993; Mulimani y col., 1997; Mansour y Khalil, 1998).

Esta enzima juega un papel importante durante los primeros estadíos de la germinación porque es la responsable de hidrolizar los oligosacáridos α -galactósidos y utilizar los azúcares resultantes durante el desarrollo de la semilla (Pridham y Dey, 1974). Existen referencias bibliográficas acerca de la presencia en semillas de leguminosas de la α -galactosidasa endógena. Dey y col., (1983) lo encontraron en lenteja, Porter y col. (1992), en soja, Mittal y Sharma (1991) o Alani y col, (1989) en *Vigna unguiculata*. Los animales monogástricos carecen de esta enzima en su intestino, por lo que no pueden utilizar los α -galactósidos, que se acumulan en el colon y son fermentados por la flora microbiana presente, con la consiguiente formación de gases de distinta naturaleza, efecto conocido como flatulencia. Esta enzima, al degradar de forma selectiva los α -galactósidos hasta azúcares más sencillos, es una enzima de suma importancia en la nutrición y que puede ser utilizada con éxito en la industria alimentaria, para añadirla posteriormente al alimento y conseguir alimentos funcionales de mejorada calidad nutricional. La enzima se ha aislado de *Aspergillus*, *Mortierella* y *Saccharomyces*

(Ayda y Elbein, 1977) y se usa con éxito en la industria alimentaria durante el procesamiento de remolacha azucarera con objeto de hidrolizar el alto contenido en rafinosa responsables de la flatulencia para la producción de sacarosa (Wong-Leun y col., 1995).

Fitasa. La fitasa o la mio-inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexafosfato fosforilasa es la enzima responsable de la desfosforilación de los fitatos y se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Konietzny y Greiner, 2002). Actúa de forma escalonada catalizando la hidrólisis del fitato (Zyta, 1992) en inositol fosfatos menos fosforilados (IP5, IP4, IP3, IP2 e IP), mio-inositol y fósforo libre (Greiner y Konietzny, 1996; Sandberg y Andlid, 2002).

La actividad fitásica de esta enzima se inicia durante la germinación de la semilla con objeto de obtener el fósforo necesario para el crecimiento de la planta (Reddy y col., 1989b). Tanto los cereales como las leguminosas presentan una alta actividad enzimática. En las semillas de las leguminosas las fitasas se encuentran en el cotiledón (Hegeman y Grabau, 2001). En el hombre y en algunos animales se ha detectado actividad fitásica en la mucosa del intestino delgado pero, sin embargo, no juega un papel importante en la digestión de los fitatos procedentes de la dieta (Iqbal y col., 1994).

Debido que los fitatos tienen gran capacidad para unirse reversiblemente con cationes divalentes reduciendo su biodisponibilidad mineral, así como con proteínas disminuyendo su digestibilidad proteica, la adición de esta enzima durante el procesamiento de los alimentos supondría una mejora sustancial en su valor nutritivo (Reddy y col., 1989b, Sandberg y Andlid, 2002). Pallauf y col. (1992), pusieron de manifiesto que la adición de fitasa a los piensos mejoraba la absorción aparente de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Ca^{2+} , así como Walz y Pallauf (2002)

encontraron que la suplementación de fitasas a la dieta de los cerdos mejoraba la digestibilidad del fósforo y calcio.

Además de la mejora nutricional del alimento suplementado con las fitasas, cabe destacar que es importante conocer en sí mismo el mecanismo de desfosforilación y los inositol fosfatos intermedios que se generan como consecuencia de la misma, pues se ha propuesto que varios de los inositol fosfatos menos fosforilados ejercen distintos efectos metabólicos en el organismo como el control de la hipercolesterolemia y aterosclerosis (Zhou y Erdman, 1995), prevención en la formación de cálculos renales (Ohkawa y col., 1984) o la reducción del riesgo de cáncer de colon (Shamsuddin, 2002). Distintos autores han demostrado que algunos de los inositol fosfatos menos fosforilados actúan como segundos mensajeros en la señal de transducción celular (Berridge e Irvine., 1989). Irvine y Moor (1986) relacionaron a los IP_4 como reguladores de la entrada de calcio a la célula desde el medio extracelular y a los IP_3 como reguladores de la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplasmático.

Parece ser que las fitasas de origen microbiano comienzan su desfosforilación en la posición 3-D del anillo del inositol y son denominadas 3-fitasas, mientras que las fitasas encontradas en las plantas y, por tanto, en las semillas de las leguminosas son 6-fitasas, cuya desfosforilación comienza en la posición L-6 o en la 4 si la configuración es D- (Zyta, 1992). Actualmente una técnica muy útil para la identificación de estos inositol fòsfatos y sus isómeros es la resonancia magnética nuclear (Phillipy, 1989; Wang y col., 1992).

Proceso de fermentación. La fermentación de las leguminosas es uno de los métodos más antiguos para conservar y preservar alimentos. Es una técnica de preparación de alimentos barata y fácil, y muy adecuada donde otros métodos son inaccesibles o no existen. Requiere una infraestructura mínima y poca energía, además de que se integra bien en la vida de las aldeas de las zonas rurales de

muchos países en desarrollo (Reddy y Salunkhe, 1989a). La fermentación de leguminosas es una fuente importante en la nutrición para países del Lejano Oriente, Asia central y Sudoeste, África y América Latina y están cobrando popularidad en los países industrializados. Se ha descrito que en el año 2838 a.C. la salsa de soja fermentada se utilizaba de forma regular en la dieta China. A lo largo de los siglos en los países orientales se han ido desarrollando diferentes alimentos fermentados, normalmente a partir de soja y son muy bien aceptados por la mayoría de la población. Tradicionalmente se trata de alimentos fermentados naturalmente, en el que la selección natural ha ido eliminando aquellos microorganismos no deseables, bien por su toxicidad o bien porque confieren al producto final características organolépticas poco atractivas (Wang y Hesseltine, 1981).

En líneas generales, la fermentación consiste en la modificación intencionada de los alimentos por la acción de determinados microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que crecen y se multiplican, consumiendo una cierta cantidad de sustrato y enriqueciéndolo con los productos de su metabolismo (Reddy y Salunkhe, 1989a; Deshpande y col., 2000).

Hay que tener en cuenta que si estos productos no tienen valor nutricional o son sustancias tóxicas, se habla de fermentación indeseable y, por tanto, no interesa; y en cambio, cuando son nutrientes y enriquecen de algún modo el alimento, hablamos de fermentación deseable y beneficiosa para la salud.

Según Wang y Hesseltine (1981), en un principio se concibió la fermentación como un método muy útil para conservar alimentos de forma segura, principalmente debido a:

- 1) Eliminación de sustancias tóxicas y/o antinutritivas: El primer paso antes de la fermentación consiste en lavar, remojar y cocinar las semillas secas,

por lo que se reducen o eliminan todos aquellos factores antinutritivos solubles y termolábiles, así como durante el desarrollo mismo del proceso fermentativo.

2) Salado: A un gran número de productos fermentados se les añade sal (cloruro sódico), inhibiendo de este modo la proliferación de los microorganismos tóxicos, sin detrimento del desarrollo de los aromas típicos. En la salsa de soja o en el miso se añaden cantidades de sal de entre 12-18% y el *Clostridium botulinum*, por ejemplo, se inhibe con un 5,6% de sal en el alimento y la *Pseudomonas* y *Salmonella* con un 5% y 6%.

3) Formación de ácidos: Durante las reacciones que se desencadenan en la fermentación se producen distintos compuestos, en su mayoría ácidos que disminuyen el pH del medio y ayudan a prolongar la vida útil del alimento.

4) Producción de sustancias bactericidas: Distintos microorganismos implicados en la fermentación producen compuestos bactericidas que, por ejemplo, actúan sobre las bacterias gram-positivas.

5) Disminución de la actividad de agua: La fermentación más comúnmente utilizada para la preparación de distintos productos, sobre todo en los países orientales, se produce en estado sólido y se elimina la humedad superficial mediante secado, consiguiendo una actividad de agua lo suficientemente baja para evitar la proliferación del crecimiento microbiano.

La fermentación, además de mejorar la inocuidad y conservación de los alimentos, enriquece la dieta mejorando las propiedades organolépticas de sabores, texturas y aromas (Reddy y Salunkhe, 1989a). Varios autores han descrito en sus trabajos la elaboración de estos productos (Tabla 19) (Beuchat 1983, Reddy y col. 1989a y Deshpande y col. 2000). La fermentación se puede producir en el grano crudo o cocido, con cáscara o sin ella, en forma de pasta machacada o de harina humedecida en estado sólido o líquido (Paredes-López y Harry 1988; Reddy y

Salunkhe 1989a; Hesseltine 1991; Deshpande y col. 2000), y se puede prolongar durante un día, semanas, meses e incluso años.

Tabla 16. Productos fermentados basados en leguminosas más frecuentemente consumidos

Nombre	Área o país	Microorganismo utilizado	Sustrato
Salsa de soja	Oriente	<i>Aspergillus oryzae</i>	soja
		<i>Pediococcus halophilus</i>	trigo
Miso	Oriente	<i>Aspergillus oryzae</i>	soja
		<i>Saccharomyces rouxii</i>	arroz
		<i>Pediococcus halophilus</i>	cebada
Tempeh	Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i>	soja
Natto	Japón	<i>Bacillus natto (subtilis)</i>	soja
Idli	India	<i>Levadura</i>	arroz
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	judías

Deshpande y col. (2000)

Las levaduras son las principales responsables de la fermentación de panes y alcoholes, los hongos en la producción de quesos y las bacterias casi exclusivamente en la fermentación de cereales, leguminosas y productos animales (Svanberg y Lorri, 1997).

En la fermentación natural de las leguminosas, de forma general, se desarrolla una fermentación anaerobia heteroláctica donde están implicadas 4 bacterias lácticas dominantes: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus* que utilizan carbohidratos para su crecimiento y desarrollo (Muck, 1991), originando ácido láctico y ácidos orgánicos, etanol y anhídrido carbónico. Como consecuencia de esta producción de ácido láctico, el pH del medio desciende hasta valores de 4-4,5. En estas condiciones, otros microorganismos patógenos como *Clostridia* y *Enterobacterias* no pueden subsistir, evitando así el deterioro del alimento, y confiriéndole mayor vida útil (Svandberg y Lorri, 1997).

La fermentación, tanto natural como utilizando cultivos iniciadores de diferentes microorganismos, mejora la calidad nutritiva de las leguminosas (Zamora y Fields 1979; Vidal-Valverde y col. 1993b; Frías y col. 1996e; Granito y col. 2002). La fermentación mejora el contenido nutritivo de los alimentos debido principalmente a la hidrólisis de proteínas, almidón y fibras, se degradan los factores antinutritivos y aparecen sustancias volátiles que les confieren aromas y sabores agradables.

La fermentación ejerce efectos beneficiosos sobre la digestibilidad proteica, aumentando su valor biológico. Geervani y Theophilus (1980) observaron un aumento en la digestibilidad proteica de varias leguminosas fermentadas durante 16 horas. Chavan y col. (1988) observaron un aumento en el contenido proteico y de aminoácidos libres después de 24 horas de fermentación de judías de mungo (*Vigna radiata*). Ragae y col. (1986) y Tabera y col. (1995) detectaron un aumento de la digestibilidad *in vitro* durante la fermentación de judías. Esto puede ser debido a la hidrólisis de las proteínas por distintas proteasas endógenas y microbianas durante la fermentación (Kazanas y Fields, 1981). Sin embargo, otros autores encontraron que la fermentación no produce cambios significativos en el producto fermentado respecto a la materia prima en términos de digestibilidad y composición de aminoácidos (Aliya y Geervani 1981; Paredes-López y Harry 1988).

Durante la fermentación de leguminosas se produce la ruptura de las cadenas de ácidos grasos presentes en la semilla, como ácido palmítico, esterárico, oléico, linoléico y linolénico para dar lugar a ácidos grasos libres y cadenas de lípidos más cortas, por la acción de las enzimas liberadas (lipasas) por los microorganismos endógenos, o por los adicionados como cultivos iniciadores. Esta liberación de ácidos grasos libres es la responsable de los aromas en los productos fermentados (Deshpande y col., 2000).

Los carbohidratos constituyen la mayor fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos, por lo que estos azúcares se van a ver afectados durante la fermentación. Umeta y Faulks (1988) observaron que los microorganismos responsables de la fermentación natural utilizaban el almidón como fuente de energía. Estos microorganismos se caracterizan por disminuir el pH y tener actividad α -amilásica y, por lo tanto, pueden hidrolizar el almidón a maltosa y usar ésta posteriormente como fuente de energía. Sotomayor y col. (1999) y Vidal-Valverde y col. (1993b) observaron un descenso en el contenido de almidón total después de fermentar de forma natural harina de lentejas. Granito y col. (2002) observaron un descenso del almidón total y almidón disponible después de la fermentación natural harina de judías durante 48 h a 42°C y un ligero incremento del contenido de almidón resistente. A su vez, durante la fermentación se produce una notable reducción de los α -galactósidos, y como consecuencia se incrementa el contenido en monosacáridos fructosa, glucosa y galactosa (Ragaei y col. 1986, Frías y col. 1996e, Granito y col. 2002).

El proceso de fermentación afecta de diferente forma al contenido de fibra alimentaria. Granito y col. (2002) observaron un significativo descenso de fibra insoluble cuando se fermentó espontáneamente harina de judía durante 48 h. Esto puede ser debido al uso de la celulosa y arabinoxilanos, componentes principales de esta variedad, por los microorganismos implicados en la fermentación. De igual modo se produjo un descenso en fibra soluble (61-94%). Vidal-Valverde y col. (1993b) detectaron un descenso importante en el contenido de celulosa y hemicelulosa durante la fermentación natural de lentejas. Sin embargo, Barampana y Simard (1995) no observaron cambios significativos en el contenido de fibra soluble cuando se fermentó *Phaseolus vulgaris* con *Lactobacillus fermentum* durante 72 h.

El contenido en vitaminas tiamina y riboflavina se ve afectado de forma diferente según las condiciones y tipo de fermentación. Así Vidal-Valverde y col. (1993b) observaron que los niveles de tiamina se modificaron ligeramente durante 48 h de fermentación natural de lentejas. Sin embargo, en el caso de la riboflavina, estos niveles se incrementaron de forma notable. El contenido en los productos fermentados va a depender de los microorganismos que participen en el proceso. Zamora y Fields (1979) detectaron un descenso en el contenido de tiamina durante la fermentación de garbanzo durante 96 h, al contrario que Paredes-López y Harry (1988) que observaron un aumento de esta vitamina en varios productos fermentados de leguminosas.

De acuerdo con Frías y col. (2004) el contenido en tocoferoles y actividad vitamínica E descendió de forma drástica en harina de altramuza sometida a fermentación natural y fermentación con *L. plantarum*, y no se observaron cambios cuando la fermentación se llevó a cabo en la semilla entera. Denter y col. (1998) observaron durante la obtención de tempeh, que el contenido en tocoferoles totales permanecía constante durante la fermentación, sin embargo, la cantidad de tocoferoles libres descendió ligeramente.

En la bibliografía existe muy poca información sobre el efecto de la fermentación en el contenido en vitamina C de leguminosas. Frías y col. (2004) observaron que el contenido en vitamina C en lupino desaparecía completamente después de fermentar naturalmente o con *L. plantarum* tanto la harina como el grano, y que era independiente de las condiciones utilizadas.

Los niveles de fitatos se ven reducidos como consecuencia del proceso fermentativo. En concreto Kozłowska y col. (1996) comprobaron como el inositol hexafosfato (IP₆) disminuía considerablemente su contenido para dar lugar a inositol fosfatos menos fosforilados y, por ello, con menor capacidad para formar complejos con cationes divalentes, cuando se llevó a cabo una fermentación

natural en lentejas (*Lens culinaris*). Granito y col. (2002), de igual modo, lo observaron durante la fermentación natural de judías (*Phaseolus vulgaris*) y Camacho y col. (1991) en lenteja, garbanzo y arveja durante la fermentación con distintas cepas del género *Lactobacillus*. Sandberg y Andlid (2002) ponen de manifiesto que la fermentación es un proceso muy efectivo para reducir considerablemente los niveles de fitatos en cereales y legumbres. Este descenso en los niveles de fitatos puede ser debido, según distintos autores, a la solubilización de los complejos formados con los minerales gracias a la disminución producida en el pH hasta valores de 3-4 (Ford y col., 1978; Martínez y col., 1996) y que las fitasas en estas condiciones aumentan su actividad (Reddy y col., 1982).

La actividad inhibidora de tripsina (TIA) desciende como consecuencia del proceso de fermentación. Tabera y col. (1995) observaron una reducción de entre 46-63% en harina de lenteja fermentada de forma natural. Ibrahim y col. (2002) detectaron la casi total eliminación del inhibidor en judías (*Vigna sinensis*), siendo la fermentación el tratamiento más efectivo para eliminar el inhibidor. Granito y col. (2002) también observaron un descenso claro en los niveles de TIA durante la fermentación natural de judías.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la fermentación puede ser un método adecuado para conseguir alimentos funcionales a partir de leguminosas.

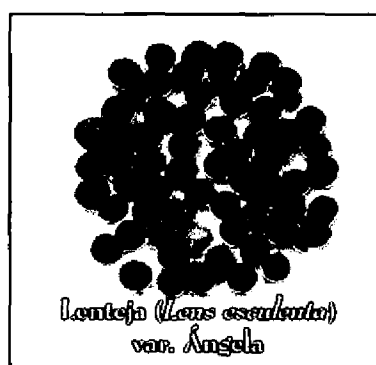
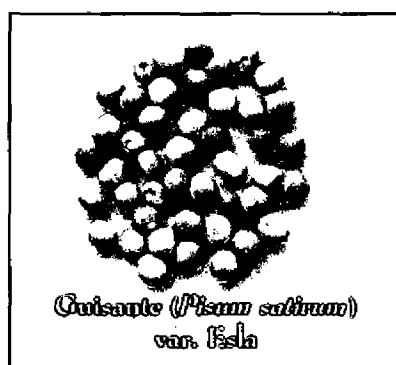
III. HARINAS FUNCIONALES DE GUISANTES Y LENTEJAS OBTENIDAS MEDIANTE LA ACCIÓN DE ENZIMAS

III. HARINAS FUNCIONALES DE GUISANTES Y LENTEJAS OBTENIDAS MEDIANTE LA ACCIÓN DE ENZIMAS

3.1. Materiales

3.1.1. Leguminosas

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron semillas de guisantes *Pisum sativum* variedad Esla y de lentejas *Lens esculenta* variedad Ángela.



Las semillas se limpiaron cuidadosamente, retirándose cualquier material extraño y se trituraron en un molino de bolas. Por último se pasaron por un tamiz de 0,5 mm de luz de malla, con el fin de obtener una harina homogénea.

3.1.2. Preparación de harinas funcionales de guisantes y lentejas

3.1.2.1. Optimización y obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la acción de α -galactosidasa endógena

Se suspendieron 20 g de harinas de guisantes o lentejas en 150 mL de agua destilada a 37°C y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N. Se añadieron 20 mL de solución tamponada ácido acético/NaOH (0,1N; pH 5,5), y se enrasó a 200 mL con agua destilada previamente calentada a 37°C. A continuación se incubaron durante 15, 30, 60 y 90 minutos en un baño termostatzado a 37°C

con agitación continua. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos a 5°C, se descartó el sobrenadante, y el residuo se congeló y liofilizó. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

3.1.2.2. Optimización y obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de α -galactosidasa comercial

El procedimiento llevado a cabo para la optimización de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de α -galactosidasa comercial E.C. 3.2.1.22 (Novo Nordisk, *Aspergillus niger*, con actividad enzimática de 1000 GALU/g; 1 GALU = Liberación de 1 μ mol de galactosa / minuto a pH 5,5 y 37°C) fue el mismo que el descrito en el apartado 3.1.2.1., pero en este caso se adicionó 1,16 mg de enzima/g harina en la solución tampón, de acuerdo con las especificaciones del enzima comercial. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

En las condiciones óptimas establecidas anteriormente, se obtuvieron harinas funcionales en mayor cantidad. Se suspendieron 500 g de harina de guisantes o lentejas en 4500 mL de agua destilada a 37°C y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N. Por último, se añadieron 500 mL de solución tamponada ácido acético/NaOH (0,1N; pH 5,5) que contenía 1,16 mg enzima/ g harina de α -galactosidasa comercial. La incubación se llevó a cabo en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 90 minutos. Posteriormente, la harina se congeló y liofilizó. Una vez homogeneizada, la harina se mantuvo a 4°C en el frigorífico en bolsas a vacío y en ausencia de luz hasta su posterior análisis. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

3.1.2.3. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de fitasa comercial

La optimización del proceso de actuación de la enzima fitasa (Phytase, Novo Nordisk L, actividad enzimática 5000 FYT/g, 1 FYT = Liberación de 1 μ mol de fosfato/minuto a pH 5,5 y 37°C) se realizó por el Dr. Jaime Antezana durante la elaboración de su Tesis Doctoral.

En las condiciones óptimas de actuación de la enzima fitasa se obtuvieron harinas funcionales como se describe a continuación. Se suspendieron 500 g de harinas de guisantes o lentejas en 4500 mL de agua destilada a 37°C y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N. Se añadieron 500 mL de solución tamponada ácido acético/NaOH (0,1N; pH 5,5) que contenía 16 mg de enzima/g harina. La incubación se llevó a cabo en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 60 minutos. Posteriormente la harina se congeló y liofilizó. Una vez homogeneizada, la harina se mantuvo a 4°C en el frigorífico en bolsas a vacío y en ausencia de luz hasta su posterior análisis. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

3.1.2.4. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la adición de tanasa comercial

La optimización del proceso de actuación de la enzima tanasa (Juelich Enzyme Products, actividad enzimática 5 U/mg) se realizó por la Dra. Montserrat Dueñas durante la elaboración de su Tesis Doctoral.

En las condiciones óptimas de actuación de la enzima tanasa se obtuvieron harinas funcionales como se describe a continuación. Se suspendieron 500 g de harinas de guisantes o lentejas en 4500 mL de agua destilada a 37°C y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N. Se añadieron 500 mL de solución tamponada ácido acético/NaOH (0,1N; pH 5,5) que contenía 0,5 mg de enzima/g harina. La

incubación se llevó a cabo en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 120 minutos. Posteriormente, la harina se congeló y liofilizó. Una vez homogeneizada, la harina se mantuvo a 4°C en el frigorífico en bolsas a vacío y en ausencia de luz hasta su posterior análisis. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

3.1.2.5. Obtención de harinas funcionales de guisantes mediante la adición de viscozyme comercial

La optimización del proceso de actuación de la enzima viscozyme (Novo Nordisk 120 L, actividad enzimática 100 FBG/g, constituido por gluconasa, arabinasa, celulasa, hemicelulasa y xilanas) se realizó por el Dr. Jaime Antezana durante la elaboración de su Tesis Doctoral.

En las condiciones óptimas de actuación de la enzima viscozyme se obtuvieron harinas funcionales como se describe a continuación. Se suspendieron 500 g de harina de guisantes en 4500 mL de agua destilada a 45°C y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N. Se añadieron 500 mL de solución tamponada ácido acético/NaOH (0,1N; pH 5,5) que contenía 1,5 mg de enzima/g harina. La incubación se llevó a cabo en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 18 horas. Posteriormente la harina se congeló y liofilizó. Una vez homogeneizada, la harina se mantuvo a 4°C en el frigorífico en bolsas a vacío y en ausencia de luz hasta su posterior análisis. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

3.1.2.6. Obtención de harinas funcionales de guisantes y lentejas mediante la actuación de enzimas endógenas

Las harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la actuación de enzimas endógenas durante 60 min, 90 min, 120 min y 18 h se llevó a cabo de

acuerdo con los apartados 3.1.2.2., 3.1.2.3, 3.1.2.4., 3.1.2.5. pero sin la adición de enzima comercial.

Las harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la actuación de enzimas endógenas se realizaron de acuerdo con el apartado 3.1.2.2. y 3.1.2.3., donde el tiempo de actuación de las enzimas endógenas fue de 60 min y 90 min. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

3.2. Métodos de análisis

3.2.1. Determinación de humedad

El contenido en agua presente en las muestras se determinó mediante el método de pérdida de peso hasta peso constante en estufa de vacío a 35°C de temperatura.

3.2.2. Determinación de carbohidratos disponibles

3.2.2.1. Análisis de monosacáridos y disacáridos

Los monosacáridos y disacáridos de las harinas de leguminosas se extrajeron, purificaron y cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con Granito y col. (2002), como se detalla a continuación:

Extracción y purificación. Se pesaron 3 g de muestra y se suspendieron en 50 mL de etanol al 80% (v/v). La mezcla se llevó a ebullición con reflujo durante 15 minutos, transcurridos los cuales se dejó enfriar. El sobrenadante se filtró a vacío a través de una placa filtrante del n°4. El proceso de extracción se repitió con el residuo dos veces más. Por último, se lavó el residuo de la placa con agua destilada, hasta que el líquido de lavado dio negativo en el test de Mölisch (Pearson, 1975).

Test de Mölisch: A 2 mL del líquido extractivo se añadieron 0,5 mL de etanol absoluto y 2 gotas de una solución de α -naftol al 20% (en metanol, v/v). A continuación, se dejó resbalar por las paredes del tubo de ensayo 2 mL ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo violeta indicó que el test de Mölisch es positivo, mientras que un anillo amarillo indicó la ausencia de azúcares en el extracto.

Se recogieron todos los líquidos extractivos y se concentraron en un rotavapor a vacío a una temperatura inferior a 40°C. El residuo seco se redisolvió en 25 mL de etanol al 50% (v/v) que se conservó en nevera a 4°C. 10 mL de esta solución se evaporó y se disolvió en 25 mL de agua destilada a la que se realizó una extracción etérea con dietileter por duplicado. Las fases acuosas se concentraron en un rotavapor y se redisolviaron en 5 mL de agua destilada. A continuación, esta solución se purificó pasándola a través de dos tipos de resinas intercambiadoras de iones en un dispensador de 1 mL que contenía 0,5 mL de resina Dowex 50-X8 (Sigma) en forma H^+ sobre otro dispensador de 1 mL con 0,5 mL de resina Dowex 1-X8 (Sigma) en forma AcO^- . Se eluyó con 20 mL de agua destilada y se concentró a sequedad en rotavapor. Por último, el residuo se disolvió en 7 mL de agua destilada, se purificó a través de un cartucho C_{18} Sep-Pack (Waters Associates) y se conservó a -20°C hasta su posterior análisis por HPLC.

La determinación de monosacáridos y disacáridos por cromatografía líquida de alta eficacia se llevó a cabo en las siguientes condiciones cromatográficas.

- Equipo.- Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de índice de refracción Waters 410.
- Columna de separación.- Carbohydrate Analysis (3,9 mm d.i. x 30 cm) acoplada a precolumna C_{18} Porasil B (3,2 mm d.i. x 4 cm).

- ♦ Fase Móvil.- Acetonitrilo/Agua Milli Q (85:15,v/v). La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH (0,45 μ m) y se desgasificó con helio. El flujo isocrático utilizado fue de 2 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección.- 100 μ L.

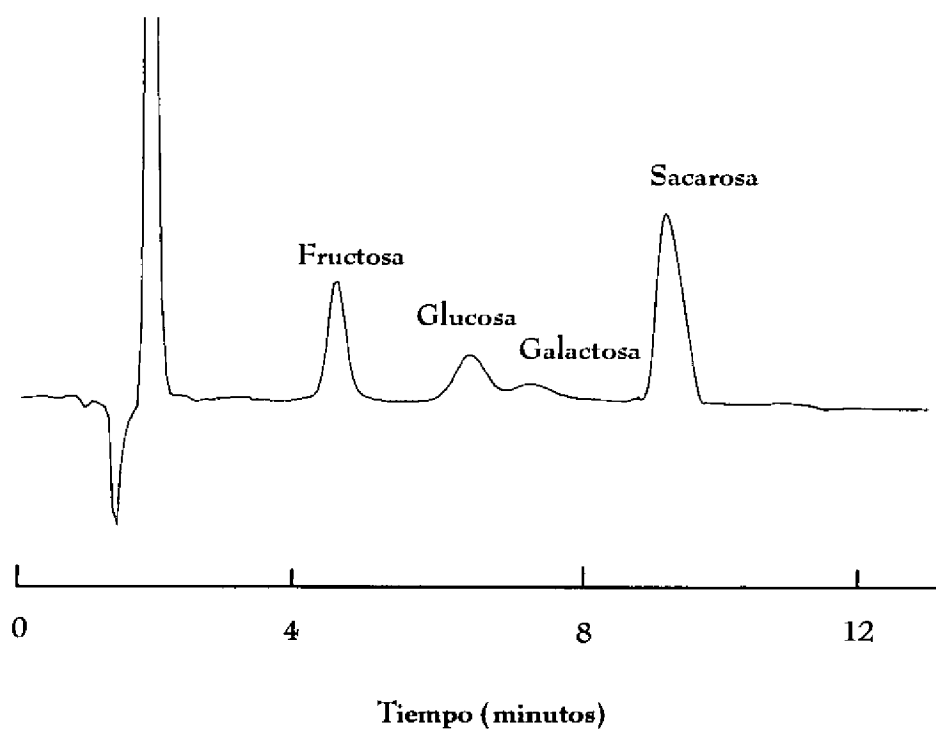
Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

Los patrones utilizados fueron una mezcla de glucosa (Merck), fructosa (Merck), galactosa (Merck) y sacarosa (Merck) disueltos en la fase móvil y filtrados a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m.

La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón realizadas de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" superiores a 0,990. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa Máxima 820 (Waters).

En la Figura 1 se muestra el cromatograma de los monosacáridos y disacáridos patrón.

Figura 1: Cromatograma de los monosacáridos y disacáridos patrón



Para determinar el contenido en carbohidratos solubles presentes en las muestras, tanto crudas como procesadas, se empleó la siguiente ecuación:

$$\%Carbohidrato = (C_i / P \times 10^6 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

C_i : μg del carbohidrato correspondiente

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

D : Factor de dilución

V : Volumen de muestra inyectado (mL)

3.2.2.2. Análisis de almidón total y disponible

El contenido en almidón total se determinó de acuerdo con Vidal-Valverde y col. (1998) usando un método basado en la digestión enzimática total de almidón a glucosa. El contenido en glucosa se midió de acuerdo con Dahlqvist (1964) y el contenido en almidón se calculó multiplicando el contenido en glucosa por 0,9. El almidón disponible se determinó de acuerdo al método desarrollado por Li y col., (1985).

200 mg del residuo procedente de la extracción de los carbohidratos solubles, se suspendieron en 30 mL de agua destilada. Los matraces se introdujeron en autoclave a 120°C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación continua y se añadieron 1,5 mL de una solución tamponada acético/acetato sódico 0,2N (pH 4,5), 1,5 mL de agua destilada y 100 µL de amiloglucosidasa (Sigma). Esta solución se mantuvo durante 3 horas (almidón total) o 30 minutos (almidón disponible) a 37°C en incubación con agitación continua a una velocidad de 120 rpm. Se inactivó la reacción enzimática mediante ebullición durante 1 minuto y se traspasó a un matraz aforado de 100 mL, lavando cuidadosamente las paredes y enrasando con agua. A continuación la solución se filtró a través de papel Whatman n° 1 y se tomó 1 mL de esta solución, enrasándolo con agua destilada a un volumen final de 25 mL.

Ensayo colorimétrico. A 1 mL de esta solución se añadió 2 mL del reactivo TGO en un tubo de ensayo, agitándolo hasta homogeneización, dejando desarrollar color durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU®-70, modelo 150, serie 1574, USA). Paralelamente se realizó un blanco utilizando 1 mL de agua destilada.

Reactivo TGO:

- ♦ Glucosa oxidasa (10.000 unidades, Sigma)
- ♦ solución tamponada tris pH 7 (61 g de hidroximetilaminometano (Sigma) en 85 mL de HCl 5N).
- ♦ solución peroxidasa: 1 mg de peroxidasa (Roche) en 1 mL de agua destilada.
- ♦ solución orto-dianisidina: 10 mg de orto-dianisidina (Sigma) en etanol al 95%.
- ♦ solución detergente tritón: 10 mL de tritón X-100 (Sigma) en 40 mL de etanol al 95%.

Para su preparación se pesaron 10 mg de la enzima glucosa-oxidasa y se disolvieron en 50 mL de solución tamponada tris pH 7, manteniéndolo en continua agitación durante 30 segundos. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de solución peroxidasa, 0,5 mL de solución orto-dianisidina y 1 mL de solución detergente tritón X-100. Por último, se enrasó con agua destilada hasta un volumen final de 100 mL y se filtró a través de una placa filtrante n°1.

Cuantificación del almidón. La cuantificación de las muestras se realizó dentro del rango lineal de una curva patrón de glucosa (Merck) 0,1-10 mg/mL. Dicha curva siempre fue de primer orden y el coeficiente de correlación "r" fue superior a 0,990. Finalmente para el cálculo del almidón presente en las muestras se multiplicó el contenido en glucosa por 0,9.

$$\%Almidón = (C \times P_M \times F / P_R \times 10^3 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

C : µg glucosa obtenida durante el ensayo

P_M : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

F: Factor de corrección glucosa-almidón

P_R : Peso del residuo después de la extracción de los carbohidratos solubles (mg)

D : Factor de dilución

V : Volumen de extracto tomado para el ensayo (mL)

3.2.3. Determinación de vitaminas hidrosolubles

3.2.3.1. Análisis de vitamina B₁

Extracción.- La extracción de vitamina B₁ o tiamina se llevó a cabo de acuerdo con Prodanov (1996). Se pesó 1 g de muestra en un matraz de 100 mL y se añadieron 30 mL de HCL 0,3M. Se agitó y se llevó a autoclave a 120°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar, añadiendo entonces una solución de acetato sódico 4N hasta alcanzar un pH entre 5-5,4. A continuación se adicionaron 5 mL de una solución acuosa de Taka-Diastasa (Sigma-Aldrich) de *Aspergillus oryzae* al 20% (p/v), se agitó y se incubó en un baño termostatzado a 45°C durante 3 horas en agitación continua. Posteriormente se dejó enfriar y se filtró con papel Whatman n°40, enrasándolo a 100 mL con agua destilada. Se filtró una alícuota a través de membrana de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro y se congeló a -20°C para su posterior cuantificación por HPLC.

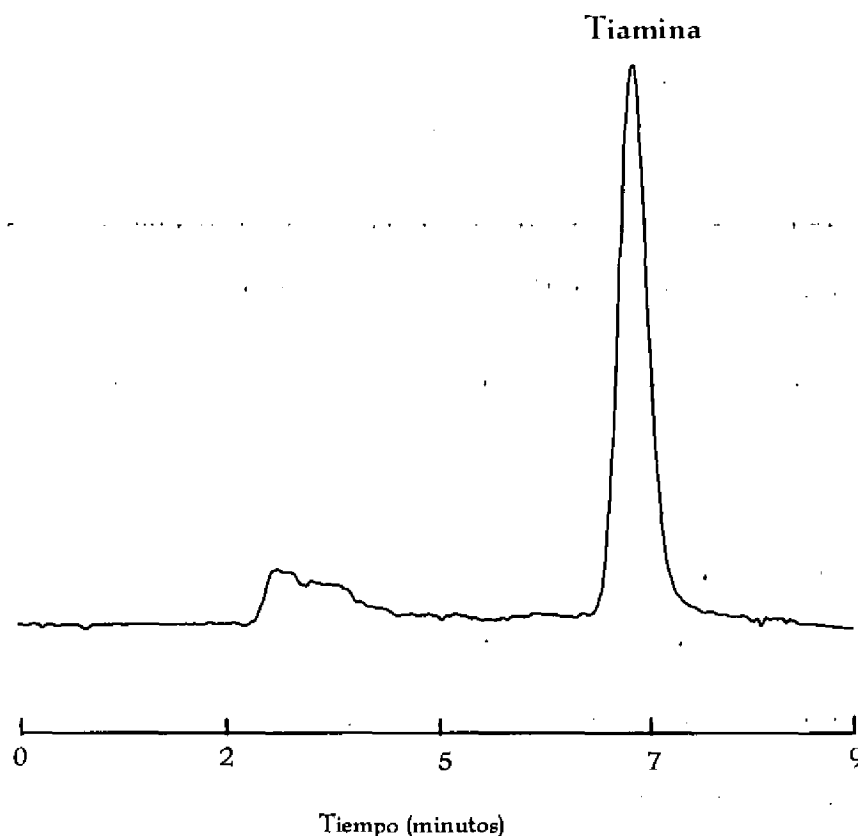
Determinación de tiamina por cromatografía líquida de alta eficacia. La determinación de tiamina se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo al método descrito por Wimalasiri y Wills (1985) modificado por Prodanov (1996), mediante derivatización postcolumna a tiócromo y detección por fluorimetría. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

- ♦ Equipo: Cromatógrafo compuesto por dos bombas Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de fluorescencia Waters 470 siendo la λ_{exc} 360 nm y la λ_{em} 435 nm.
- ♦ Columna de separación: μ Bondapak C_{18} (3,9 mm d.i. x 30 cm, 10 μ m) acoplada a precolumna C_{18} /Porasil B, Bondapak (3,9 mm d.i. x 20 mm).
- ♦ Sistema de termostatación (Haake D8) de la columna de separación a 30°C.
- ♦ Conexión en T de acero inoxidable a la salida de la columna de separación, y tubo de reacción de acero inoxidable (3,0 m x 0,5 mm d.i.).
- ♦ Fase Móvil: Metanol/Agua/Ácido acético (27:72,5:0,5,v/v/v) y hexasulfonato sódico 5 mM. La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m y se degasificó con helio. Se utilizó un flujo isocrático a 1,2 mL/min.
- ♦ Reactivo cromóforo: Ferricianuro potásico 1mM ($K_3Fe(CN)_6$, Merck) en solución de NaOH 0,25M. Se utilizó un flujo isocrático a 0,7 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección: 50 μ L

Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos de tiamina se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones procesados e inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

En la Figura 2 se muestra el cromatograma del patrón de tiamina.

Figura 2: Cromatograma de un patrón de tiamina



La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" fueron superiores a 0,990. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa Máxima 820 (Waters).

La cuantificación se llevó a cabo a partir de una solución madre de clorhidrato de tiamina (Sigma) con media molécula de agua disueltos en HCL 0,01M, por lo que con objeto de expresar las concentraciones de dichos patrones como tiamina, se aplicó el siguiente factor de corrección:

$$\text{Factor corrección tiamina} = \frac{\text{Peso molecular tiamina}}{\text{Peso molecular tiamina HCl } 0,5 \text{ H}_2\text{O}}$$

$$\text{Factor corrección tiamina} = \frac{265,4}{346,3} = 0,7664$$

Las soluciones patrón se procesaron de igual forma que las muestras dentro de los rangos de concentración: 0,3 – 12 ng/inyección.

$$\text{mg Tiamina}/100\text{g} = (C \times F / P \times 10^3 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

C : ng de tiamina

F: factor de corrección clorhidrato de tiamina-tiamina

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

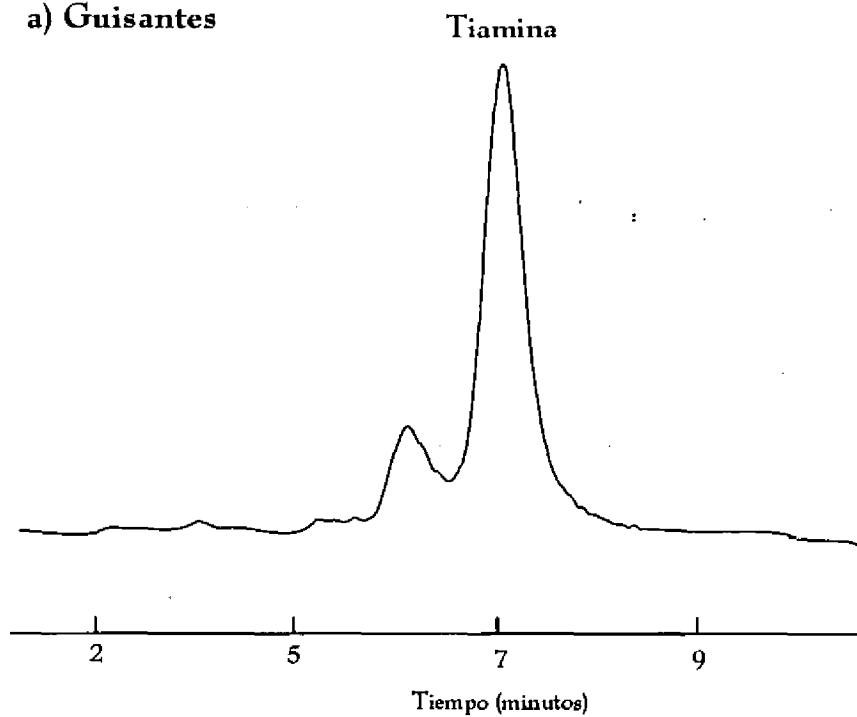
D : Factor de dilución

V : Volumen de muestra inyectado (mL)

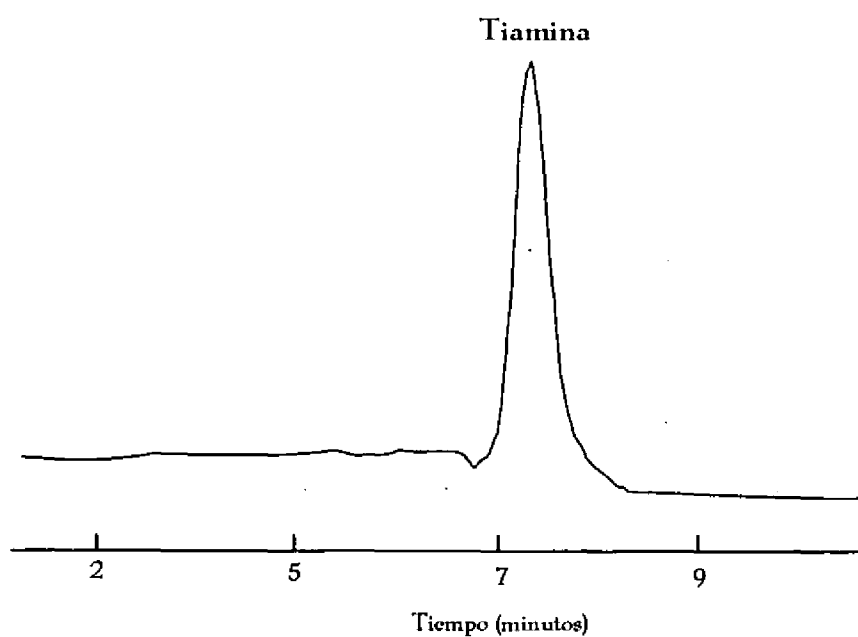
En las Figuras 3a y 3b se muestran los cromatogramas de tiamina en las leguminosas estudiadas.

Figura 3: Cromatogramas de tiamina en las leguminosas estudiadas

a) Guisantes



b) Lentejas



3.2.3.2. Análisis de vitamina B₂

Extracción. Se llevó a cabo de acuerdo con Prodanov (1996), como se indica en el apartado 3.2.3.1.

Determinación de riboflavina por cromatografía líquida de alta eficacia. La determinación de riboflavina en los extractos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con Prodanov (1996).

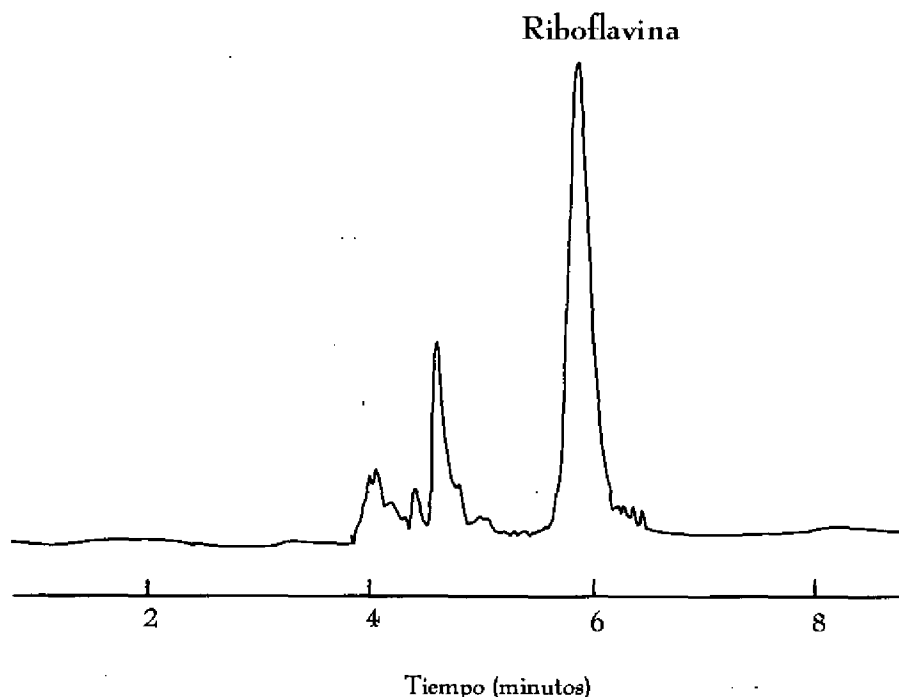
Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ Equipo: Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de fluorescencia Waters 470, siendo la λ_{exc} 445 nm y la λ_{em} 520 nm.
- ♦ Columna de separación: Spherisorb ODS2 (3,9 mm d.i. x 30 cm, 10 μ m) acoplada a precolumna C₁₈/Porasil B (3,9 mm d.i. x 20 mm)
- ♦ Sistema de termostatación (Haake D8) de la columna de separación a 35°C.
- ♦ Fase Móvil: Metanol/Agua Milli Q/Acido acético (31:68,5:0,5,v/v/v) y hexasulfonato sódico (Aldrich) 5 mM. La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m y se desgasificó con helio. El flujo isocrático fue de 1,2 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección: 50 μ L

Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos de riboflavina se realizó por comparación con los tiempos de retención con patrones procesados e inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa Máxima 820 (Waters).

En la Figura 4 se muestra el cromatograma del patrón de riboflavina.

Figura 4: Cromatograma de un patrón de riboflavina



La cuantificación se llevó a cabo a partir de una solución madre de riboflavina (Sigma) disuelta en HCL 0,01M. Las soluciones patrón se procesaron de igual forma que las muestras dentro de los rangos de concentración: 0,2 – 12 ng/inyección.

$$mg \text{ Riboflavina}/100g = (C / P \times 10^3 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

C : ng de riboflavina

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

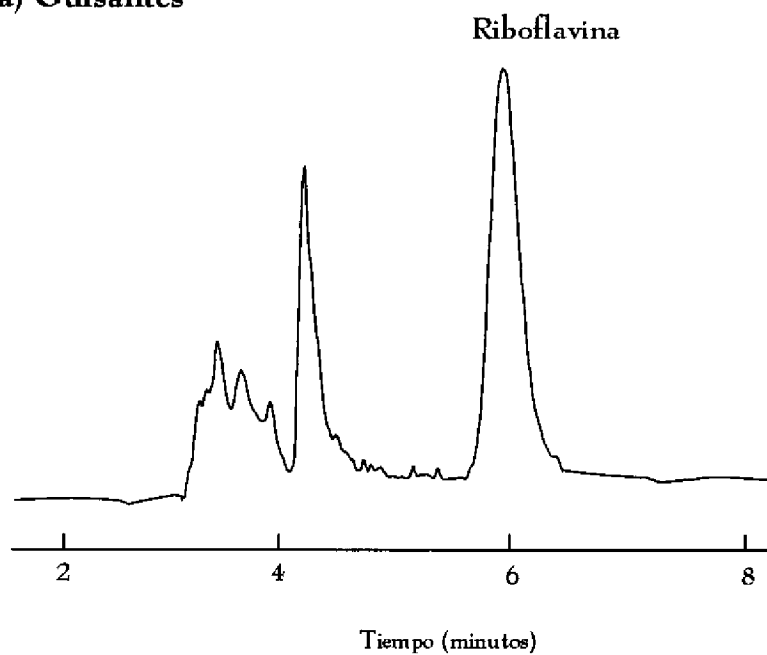
D : Factor de dilución

V : Volumen de muestra inyectado (mL)

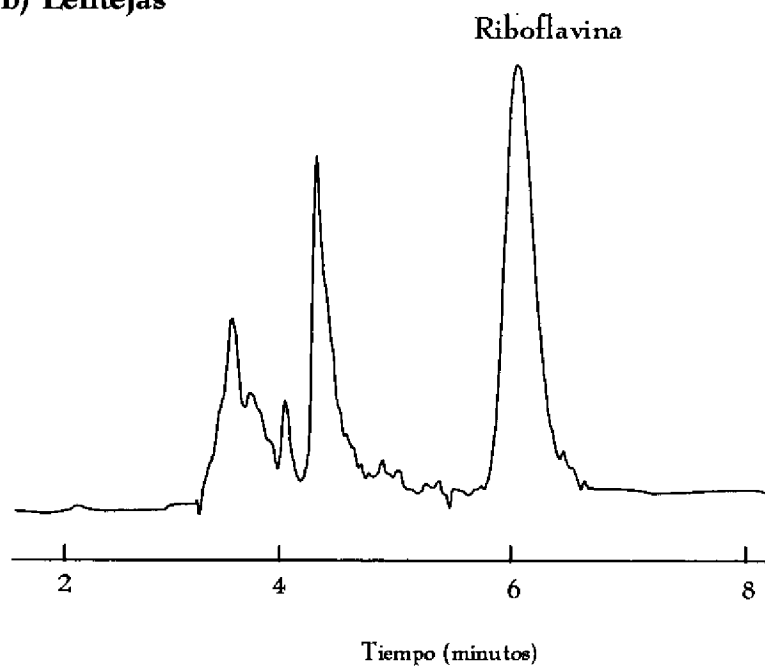
En las Figuras 5a y 5b se muestran los cromatogramas de riboflavina de las leguminosas estudiadas.

Figura 5: Cromatogramas de riboflavina en las leguminosas estudiadas

a) Guisantes



b) Lentejas



3.2.4. Determinación de factores antinutritivos

3.2.4.1. Análisis de α -galactósidos

Los α -galactósidos de las muestras se extrajeron y purificaron como quedó detallado en el apartado 3.2.2.1. y se determinaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con Granito y col. (2002). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

- ♦ Equipo: Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de índice de refracción Waters 410.
- ♦ Columna de separación: Carbohydrate Analysis (3,9 mm d.i. x 30 cm) acoplada a precolumna C₁₈ Porasil B (3,2 mm d.i. x 4 cm)
- ♦ Fase Móvil: Acetonitrilo/Agua Milli Q (75:25,v/v). La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m y se desgasificó con helio. El flujo isocrático utilizado fue 2 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección: 100 μ L

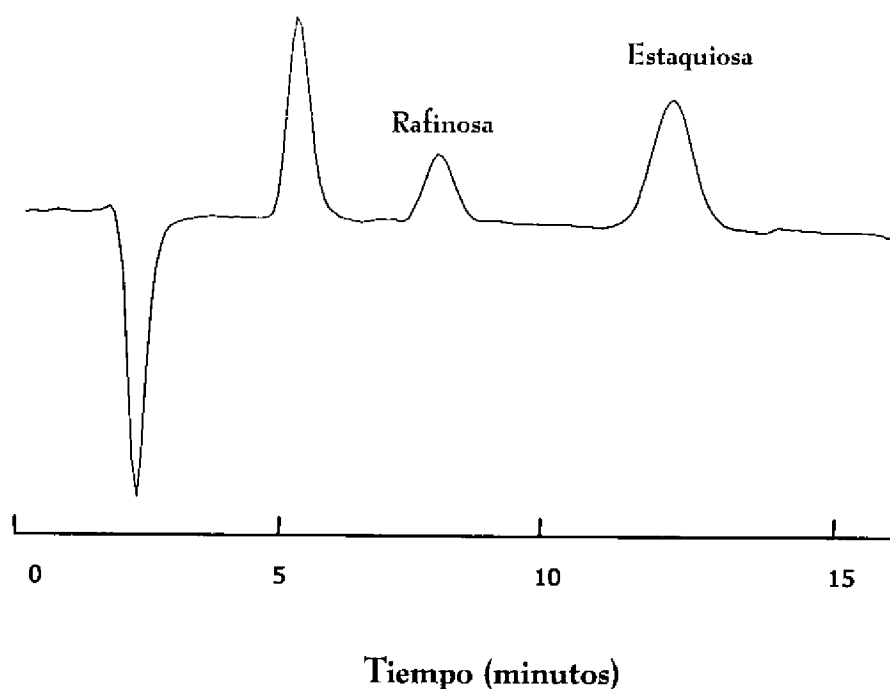
Identificación y cuantificación de α -galactósidos. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención con patrones inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

Las soluciones patrones utilizadas fueron una mezcla de rafinosa (Sigma) y estaquiosa (Sigma) disueltas en la fase móvil correspondiente y filtradas a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m. El trisacárido ciceritol y el pentasacárido verbascosa, al no comercializarse, se cuantificaron teniendo en cuenta la recta de calibrado del patrón trisacárido rafinosa y del patrón tetrasacárido estaquiosa, respectivamente.

La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" fueron superiores a 0,990. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa de trabajo Máxima 820 (Waters).

En la Figura 6 se muestra el cromatograma de los α -galactósidos patrón.

Figura 6: Cromatograma de los α -galactósidos patrón



Para determinar el contenido en estos carbohidratos solubles presentes en las muestras estudiadas, se empleó la siguiente ecuación:

$$\%Carbohidrato = (C_i / P \times 10^6 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

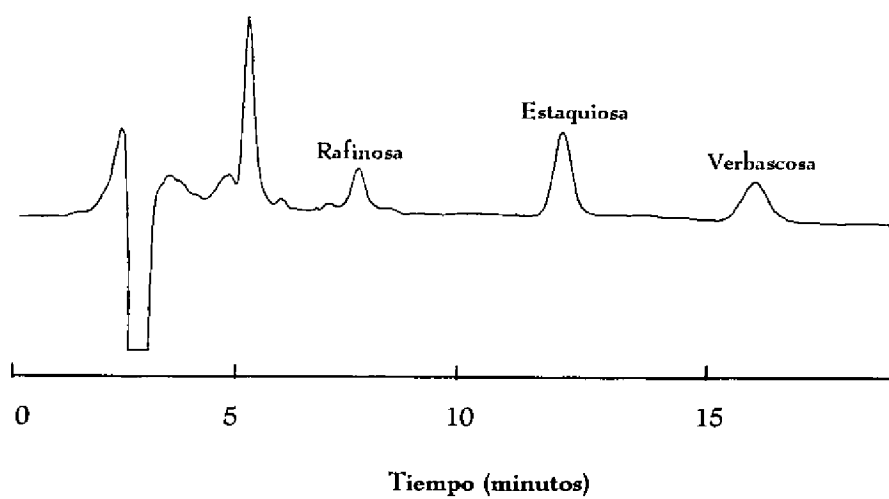
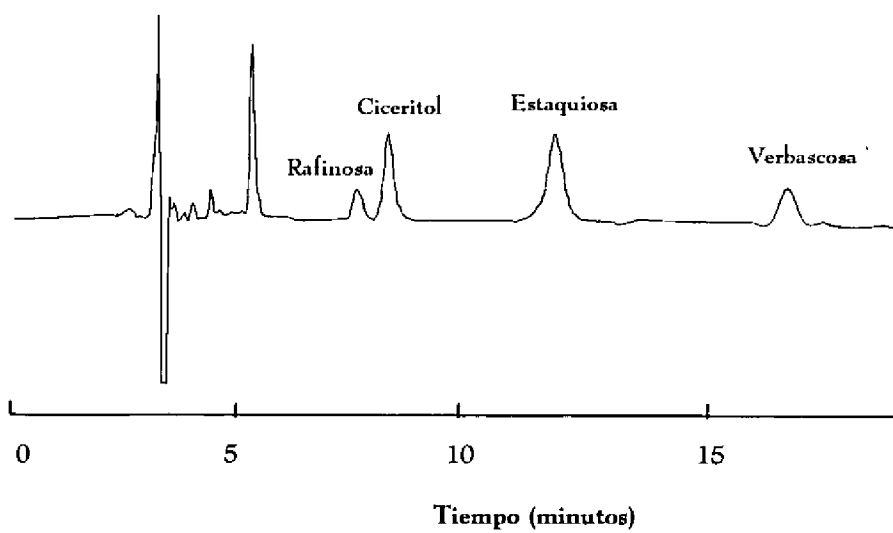
C_i : µg del carbohidrato correspondiente

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

D : Factor de dilución

V : Volumen de muestra inyectado (mL)

En las Figuras 7a y 7b se muestran los cromatogramas de los α-galactósidos de las leguminosas estudiadas.

Figura 7: Cromatogramas de los α -galactósidos de las leguminosas estudiadas**a) Guisantes****b) Lentejas**

3.2.4.2. Análisis de inositol fosfatos

El método utilizado para la extracción y purificación de los inositol fosfatos fue el propuesto por Kozłowska y col. (1996), como se detalla a continuación.

Extracción y purificación. A 0,5 g muestra se adicionaron 20 mL de HCl 0,5M y se mantuvo en baño con agitación continua a 20°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm a 5°C durante 30 minutos. El sobrenadante se congeló a -20°C durante la noche y se volvió a centrifugar en las condiciones indicadas anteriormente. Se tomaron 15 mL y se concentraron en rotavapor a vacío (a temperatura inferior a 35°C) hasta sequedad. El residuo se disolvió en 20 mL de agua destilada con ayuda del ultrasonido. El extracto se purificó pasándolo a través de resina Dowex 50-X8 H⁺ (Sigma), 200-400 mesh a pH neutro. Se lavó la resina con 15 mL de agua destilada y se eliminó el líquido eluido. Por último se pasaron 12 mL de HCl 2M que arrastró los inositol fosfatos de la columna y se concentró en rotavapor a vacío (a temperatura inferior a 35°C) hasta obtener un residuo seco. El residuo se disolvió en 2 mL de agua destilada y se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro y se congeló a -20°C.

Determinación de inositol fosfatos por cromatografía líquida de alta eficacia. La cuantificación del ácido fítico en los extractos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), de acuerdo al método desarrollado por Lehrfeld (1994), como se detalla a continuación.

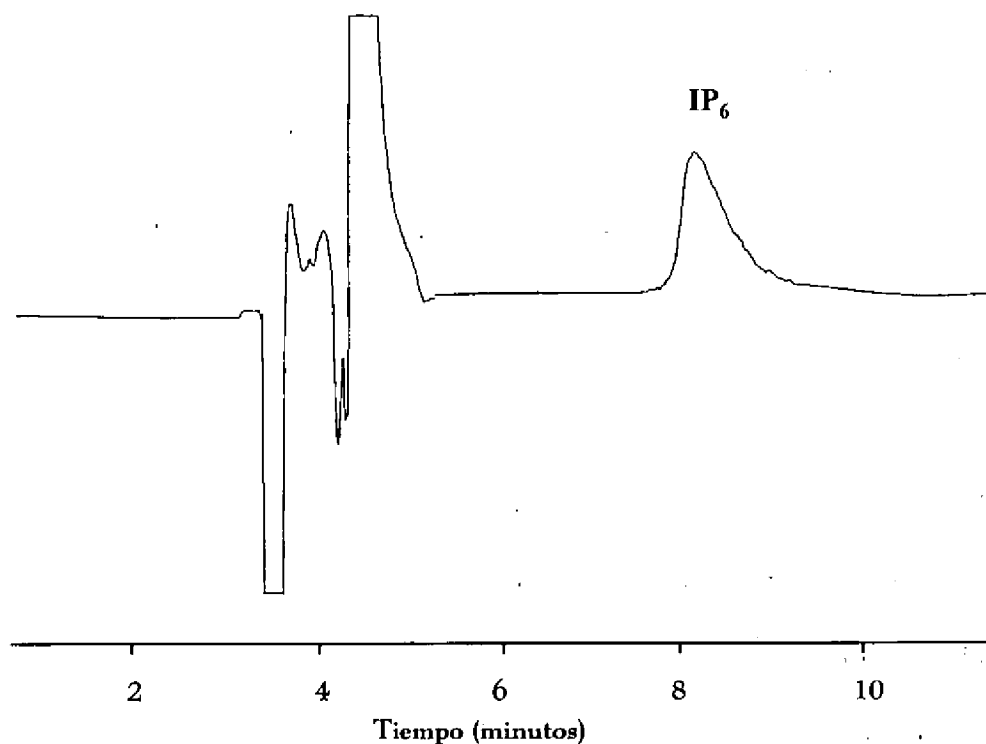
- Equipo: Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de índice de refracción Waters 410.
- Columna de separación: Hypersil-ODS C₁₈ (3,9 mm d.i. x 30 cm, 5µm) acoplada a precolumna C₁₈ (3,9 mm d.i. x 20 mm).

- ♦ Sistema de termostatación de la columna: 45°C en Temperature control module, (Waters).
- ♦ Fase Móvil: Metanol /Agua MilliQ/Hidróxido de tetrabutilamonio/Ácido sulfúrico 5M/Ácido fórmico 91%/ Solución ácido fítico (5 mg/mL) (515:485:8:1:0,5:0,2, v/v/v/v/v/v) pH 4,1. La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH (0,45 μ m) y se desgasificó con helio. El flujo isocrático utilizado fue 1 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección: 20 μ L.

Identificación y cuantificación de inositol fosfatos. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones de fitato sódico (IP₆) e hidrolizados de inositol fosfatos menos fosforilados obtenidos después de la hidrólisis del fitato sódico en HCl 2N, de acuerdo con Türk y col. (2000), inyectados en idénticas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa Máxima 820 (Waters).

En la Figura 8 se muestra el cromatograma del patrón de ácido fítico (IP_6).

Figura 8: Cromatograma de ácido fítico patrón



La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" fueron superiores a 0,990. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa de trabajo Máxima 820 (Waters).

La cuantificación se llevó a cabo a partir de una solución madre de fitato sódico (Sigma) en agua doblemente destilada (4 mg/mL) por lo que, con objeto de expresar las concentraciones de dichos patrones como ácido fítico, se aplicó el siguiente factor de corrección a las concentraciones de la curva patrón:

$$\text{Factor corrección ácido fítico} = \frac{\text{Peso molecular ácido fítico}}{(\text{Peso molecular fitato sódico} \times 100) / \text{humedad (\%)}}$$

$$\text{Factor corrección ácido fítico} = \frac{660}{(923,83 \times 100)/90,94} = 0,65$$

$$\% \text{Inositol fosfato} = (C_i \times F / P \times 10^6 \times D \times V) \times 100$$

Donde:

C_i : µg del inositol fosfato

F: factor de conversión fitato-ácido fítico (0,65)

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

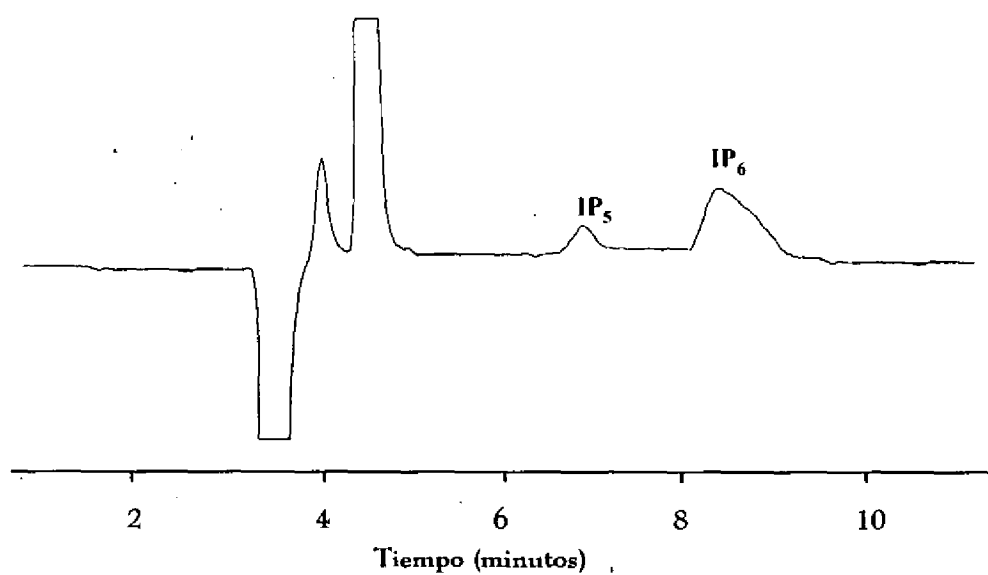
D : Factor de dilución

V : Volumen de muestra inyectado (mL)

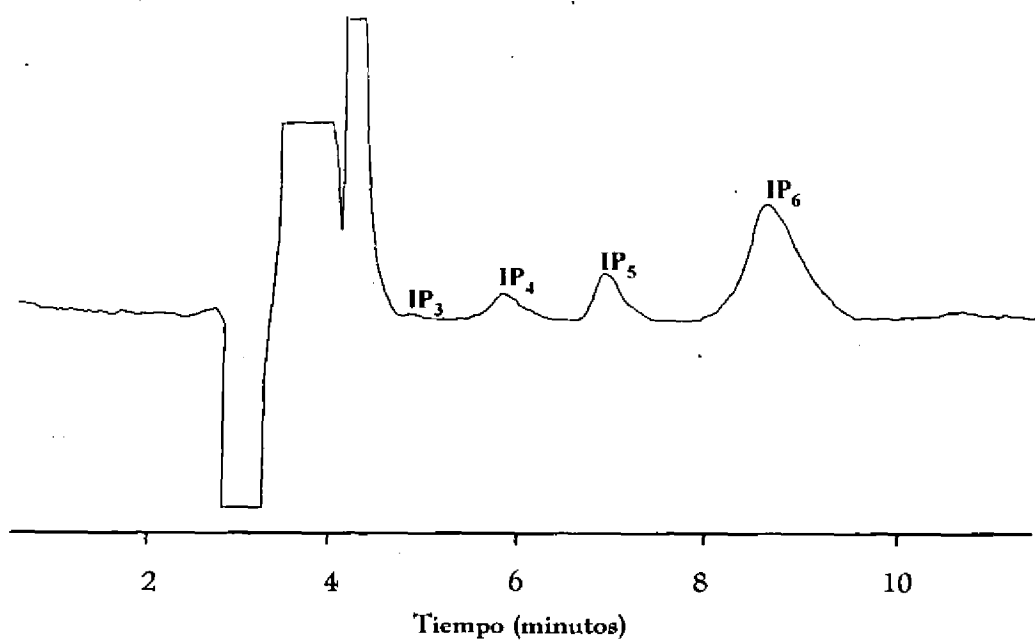
En las Figuras 9a y 9b se muestran los cromatogramas de los inositol fosfatos en las leguminosas estudiadas.

Figura 9: Cromatogramas de los inositol fosfatos en las leguminosas estudiadas

a) Guisantes



b) Lentejas



3.2.4.3. Análisis de la actividad inhibidora de tripsina

La determinación de la actividad inhibidora de tripsina se realizó de acuerdo al método desarrollado por Kakade y col. (1974), modificado por Valdebouze y col. (1980) y posteriormente utilizado por Vidal-Valverde y col. (1993b) y Granito y col. (2002).

Extracción. Se pesó 1g de muestra y se disolvió en 200 mL de HCl 0.03%, ajustándose el pH a 2,8 con HCl 2N, y se mantuvo en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos a 5°C. Se recogió el sobrenadante y se filtró a vacío a través de papel Whatman n°1, manteniéndose en el frigorífico hasta el momento del ensayo.

Determinación de la actividad inhibidora de tripsina. Se llevó a cabo utilizando una batería de tubos de ensayo termostatizados en un baño a 37°C, en el que se añadieron cantidades crecientes del extracto ajustándose con agua destilada hasta un volumen final de 2 mL. A cada tubo de ensayo se adicionó 2 mL de una solución de tripsina y se agitó vigorosamente; a continuación se añadió 5 mL de la solución sustrato BAPNA (N α -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida, Sigma) y se volvió a agitar. Transcurridos exactamente 10 minutos se inactivó la reacción enzimática con 1 mL de ácido acético al 30%.

Simultáneamente, en 2 tubos de ensayo se prepararon los blancos de la reacción. Uno de ellos, denominado blanco reactivo, contenía 2 mL de agua destilada al que se adicionó 2 mL de la solución de tripsina y 1 mL de ácido acético al 30%, agitándose vigorosamente. Por último se añadieron 5 mL de BAPNA dejando transcurrir la reacción enzimática durante 10 minutos exactos. El otro blanco, denominado blanco sustrato, contenía 2 mL de extracto sobre el que se adicionaron 5 mL de BAPNA. Transcurridos 10 minutos, medidos

exactamente, se inactivó la reacción enzimática con 1 mL de ácido acético al 30%. Por último, se añadió 2 mL de solución de tripsina.

Se midió la absorbancia a 410 nm de todos los tubos en el espectrofotómetro (Beckman DU-70 spectrophotometer) utilizando el blanco sustrato para realizar la calibración del mismo.

Los reactivos y soluciones utilizadas fueron los siguientes:

- ♦ Solución tampón: Se disolvieron 4,4 g de cloruro cálcico (Merck) y 6,05 g de trizma base ($C_4H_{11}NO_3$, Sigma) en agua destilada y se enrasaron a 1L. Se ajustó el pH a 8.2 con HCl 2N y se mantuvo a 37°C hasta el momento de su uso. Esta solución se preparó diariamente.
- ♦ Solución de sustrato: Se disolvieron 80 mg de BAPNA (Sigma) en 2 mL de dimetilsulfóxido (Merck) y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Esta solución es estable durante varias semanas en el congelador. En el momento del ensayo se diluyó con la solución tampón hasta 200 mL y se mantuvo a 37°C hasta su posterior utilización, siendo estable durante las 4 horas siguientes a su preparación.
- ♦ Solución de enzima: Se disolvieron 2 mg de tripsina (Tripsina Pancreática Tipo III de páncreas bovino (Sigma) en 100 mL de HCl 0,001M. Esta solución se mantuvo en hielo durante todo el ensayo.

Con anterioridad a la cuantificación de la actividad inhibidora de tripsina se realizó una curva de saturación enzima-sustrato, ya que es necesario determinar qué cantidad de muestra se necesita para conseguir una inhibición del 100% de la enzima. Para ello se representó gráficamente la absorbancia medida a 410 nm frente al volumen de extracto utilizado. Una vez conocida esta cantidad se determinaron la cantidad necesaria para conseguir una inhibición de la tripsina del 40%. A partir de este dato se procedió a determinar la actividad inhibidora de

tripsina de las distintas muestras. Con la cantidad necesaria de muestra para producir una saturación de la enzima del 40% se realizó el mismo ensayo enzimático descrito anteriormente. Se representó gráficamente la absorbancia corregida $((A_{\text{MUESTRA}} - (A_{\text{BLANCO SUSTRATO}} \times \text{VOLUMEN}_{\text{EXTRACTO}} / 2))$ medida a 410 nm frente al volumen de extracto utilizado, ya que se debe considerar la posible absorbancia que se pueda desarrollar en los tubos debido a la coloración propia del extracto. Los datos de la actividad inhibidora de tripsina se expresaron como unidades de inhibidor de tripsina por mg de muestra (TIU/mg) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TIU / mg \text{ muestra} = a / (0,01 \times C)$$

Donde:

a : Pendiente de la recta representada

C : Concentración de la muestra expresada en mg/mL

Una unidad de inhibición de tripsina (TIU) se define como el descenso en 0,01 unidades de absorbancia.

3.2.5. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados por el multifactor ANOVA usando el método de los mínimos cuadrados con el programa Statgraphic 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA) para Windows y el programa Estadística 4.5 para Windows, con un equipo informático PC.

3.3. Resultados sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación "Transformación y mejora del valor nutritivo de leguminosas mediante adición de enzimas" financiado por la CICYT (ALI 97- 0636), en el que participaron diferentes grupos de investigación pertenecientes a la Universidad Autónoma de Madrid, a la Facultad de Farmacia de Granada y al Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). En dicho proyecto multidisciplinar se han llevado a cabo distintas tareas en las que cada grupo optimizaba harinas funcionales obtenidas en función de aquellos compuestos en los que el grupo estaba especializado. La finalidad del presente trabajo ha sido la obtención de harinas funcionales de leguminosas mediante la actuación selectiva sobre determinados factores antinutritivos (α -galactósidos, ácido fítico o taninos) y en el caso del guisante, también modificando los componentes de la pared celular.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la optimización de las condiciones de obtención de harinas funcionales de leguminosas mediante la actuación de α -galactosidasas. También hemos realizado en todas las harinas funcionales obtenidas la valoración de determinados compuestos que previamente no habían sido estudiados por los demás grupos de investigación.

3.3.1. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de guisantes y lentejas

Se han realizado una serie de experimentos en los que se estudiaron el efecto de la α -galactosidasa endógena o adición de α -galactosidasa comercial sobre el contenido en α -galactósidos de las harinas de guisantes o lentejas con objeto de valorar el periodo de tiempo necesario para que el contenido en dichos compuestos

sea menor. El proceso de actuación de la de α -galactosidasa comercial incluye el de la α -galactosidasa endógena y la comercial.

3.3.1.1. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de guisantes

Los carbohidratos solubles que contienen los guisantes (*Pisum sativum* var. Esla) son: sacarosa (1,73%) y los α -galactósidos rafinosa (0,56%), estaquiosa (2,24%) y verbascosa (2,39%). El contenido en almidón total y disponible es de 42,65% y 38,70%, respectivamente, y el de carbohidratos disponibles totales es de 40,44% (suma de almidón disponible y el total de carbohidratos solubles disponibles). Los niveles de tiamina y riboflavina fueron de 0,73 mg/100g s.s. y 0,15 mg/100g s.s, respectivamente. Los guisantes presentaron un contenido en inositol hexafosfato (IP₆) e inositol pentafofato de 0,34% y 0,04% respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina en el guisante crudo fue de 8,69 TIU/mg s.s. (Tablas 21 y 22).

a) Efecto de la acción de la α -galactosidasa endógena en harinas de guisantes

La cinética de actuación de la α -galactosidasa endógena sobre el contenido en monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), disacáridos (sacarosa) y α -galactósidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) de las harinas de guisantes se encuentra recogido en la Tabla 17 y Gráficos 1a y 1b.

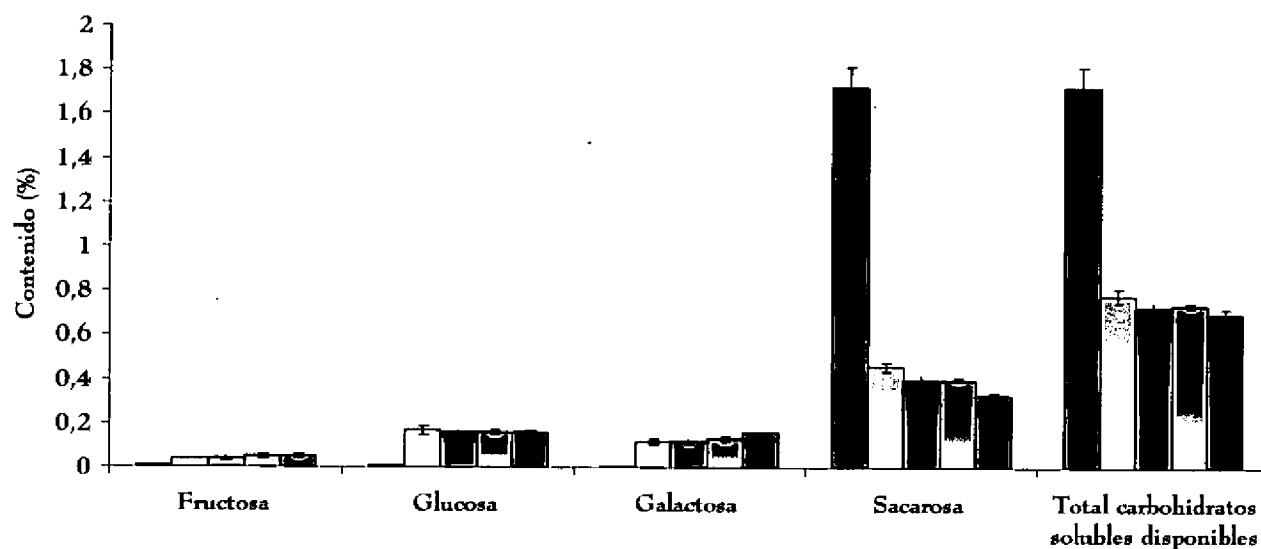
Tabla 17. Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa endógena en el contenido de carbohidratos solubles de guisantes (*Pisum sativum* var. Esia)*

Guisantes	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Rafinosa	Estaquiosa	Verbascosa	Total α -galactósidos
Crudos	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,73 \pm 0,09 ^d	0,56 \pm 0,02 ^c	2,24 \pm 0,07 ^b	2,39 \pm 0,07 ^d	5,19 \pm 0,07 ^e
15 minutos	0,04 \pm 0,00 ^b	0,17 \pm 0,02 ^b	0,12 \pm 0,01 ^b	0,46 \pm 0,02 ^c	0,23 \pm 0,01 ^b	0,52 \pm 0,01 ^a	0,79 \pm 0,01 ^c	1,54 \pm 0,02 ^d
30 minutos	0,04 \pm 0,01 ^{bc}	0,16 \pm 0,02 ^b	0,12 \pm 0,01 ^b	0,40 \pm 0,02 ^b	0,20 \pm 0,00 ^b	0,55 \pm 0,01 ^a	0,34 \pm 0,04 ^b	1,09 \pm 0,02 ^c
60 minutos	0,05 \pm 0,01 ^c	0,16 \pm 0,02 ^b	0,13 \pm 0,01 ^c	0,40 \pm 0,01 ^b	0,13 \pm 0,02 ^a	0,54 \pm 0,04 ^a	0,31 \pm 0,02 ^b	0,98 \pm 0,02 ^b
90 minutos	0,05 \pm 0,01 ^c	0,16 \pm 0,02 ^b	0,16 \pm 0,00 ^d	0,33 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a	0,52 \pm 0,01 ^a	0,24 \pm 0,03 ^a	0,87 \pm 0,01 ^a

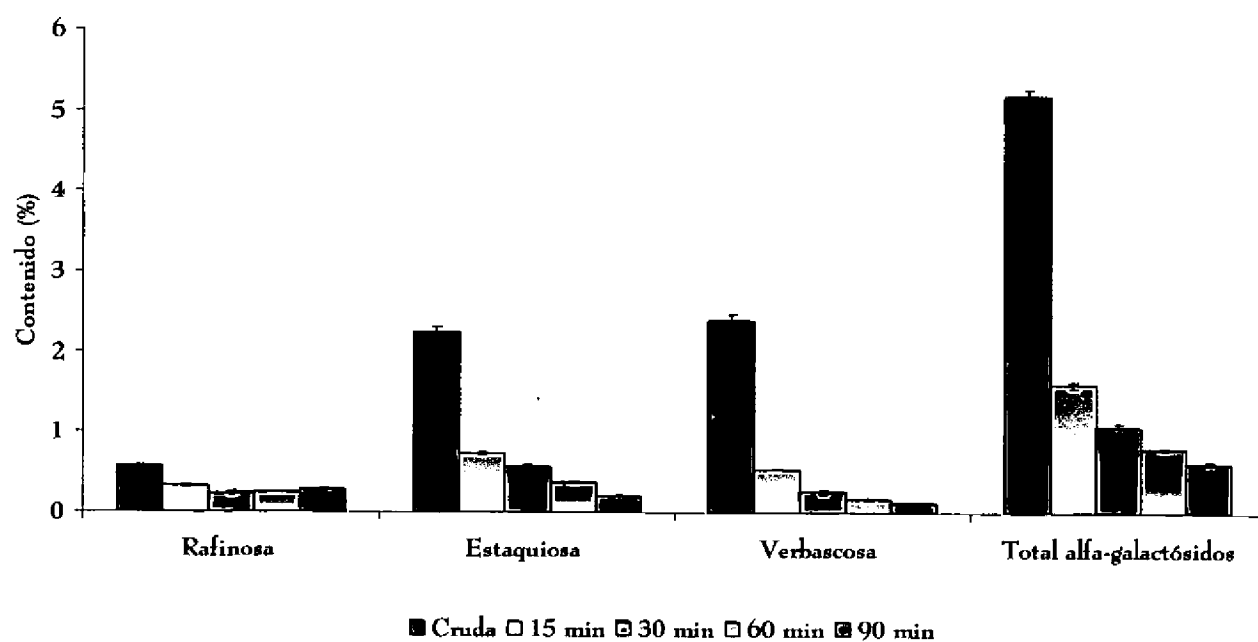
*(g/100g s.s.). Valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones. ND=No detectado. La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P\leq 0,05$).

Gráfico 1: Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa endógena en el contenido de carbohidratos solubles de guisantes (*Pisum sativum* var. Esla)

a) Carbohidratos solubles disponibles



b) α -Galactósidos



Durante los primeros 15 minutos de actuación de la α -galactosidasa endógena se produjo un gran descenso en los niveles de los α -galactósidos rafinosa (59%), estaquiosa (77%) y verbascosa (67%). El contenido en sacarosa se redujo en un 73% y se detectaron los monosacáridos fructosa, glucosa y galactosa, que no estaban presentes en la semilla cruda. Después de 30 minutos no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el contenido en carbohidratos respecto al periodo anterior, con excepción de la verbascosa, que llegó a descender un 86%. Cuando el proceso se prolongó durante 60 minutos, el contenido en carbohidratos no cambió significativamente ($P \leq 0,05$) con respecto al de 30 minutos, excepto el de rafinosa que descendió hasta un 76%. Al aumentar el tiempo de actuación de la α -galactosidasa endógena a 90 minutos el contenido en verbascosa descendió aún más (90%), mientras que aumentó el de galactosa.

b) Efecto de la adición de la α -galactosidasa comercial en las harinas de guisantes

La cinética de actuación de la α -galactosidasa comercial sobre el contenido en monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), disacáridos (sacarosa) y α -galactósidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) de las harinas de guisantes se encuentra recogido en la Tabla 18 y Gráficos 2a y 2b.

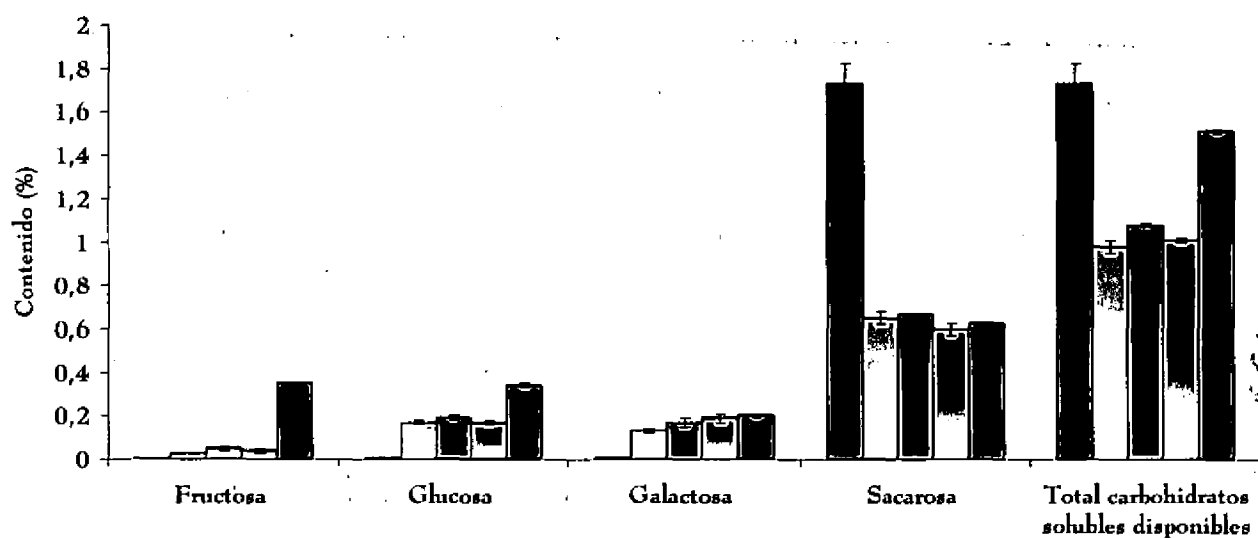
Tabla 18. Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa comercial en el contenido de carbohidratos solubles de guisantes (*Pisum sativum* var. Esla)*.

Guisantes	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Rafinosa	Estaquiosa	Verbascosa	Total α -galactósidos
Crudos	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,73 \pm 0,09 ^c	0,56 \pm 0,02 ^d	2,24 \pm 0,07 ^c	2,39 \pm 0,07 ^d	5,19 \pm 0,07 ^e
15 minutos	0,03 \pm 0,00 ^b	0,17 \pm 0,01 ^b	0,13 \pm 0,01 ^b	0,65 \pm 0,03 ^b	0,33 \pm 0,01 ^c	0,74 \pm 0,02 ^d	0,54 \pm 0,01 ^c	1,60 \pm 0,04 ^d
30 minutos	0,05 \pm 0,01 ^c	0,19 \pm 0,01 ^c	0,17 \pm 0,02 ^c	0,67 \pm 0,00 ^b	0,24 \pm 0,02 ^a	0,57 \pm 0,03 ^c	0,26 \pm 0,02 ^b	1,07 \pm 0,05 ^c
60 minutos	0,04 \pm 0,01 ^c	0,17 \pm 0,01 ^b	0,19 \pm 0,02 ^d	0,60 \pm 0,03 ^a	0,25 \pm 0,00 ^a	0,38 \pm 0,02 ^b	0,17 \pm 0,02 ^{ab}	0,80 \pm 0,02 ^b
90 minutos	0,35 \pm 0,00 ^d	0,34 \pm 0,01 ^d	0,20 \pm 0,01 ^d	0,63 \pm 0,00 ^a	0,29 \pm 0,01 ^b	0,21 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,00 ^a	0,62 \pm 0,02 ^a

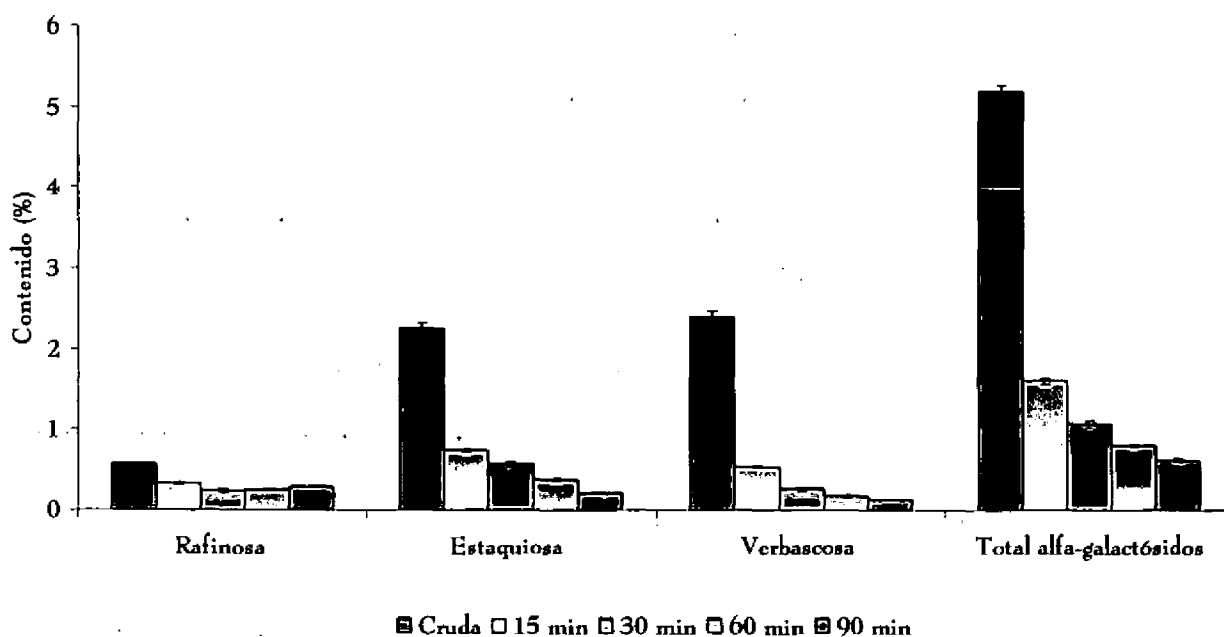
*(g/100g s.s.). Valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones. ND=No detectado. La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Gráfico 2: Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa comercial en el contenido de carbohidratos solubles de guisantes (*Pisum sativum* var. Esla)

a) Carbohidratos solubles disponibles



b) α -Galactósidos



En las harinas de guisante incubadas durante 15 minutos con α -galactosidasa comercial se observó un notable descenso en el contenido en sacarosa (62%), rafinosa (41%), estaquiosa (67%) y verbascosa (77%). Se detectó la presencia de fructosa, glucosa y galactosa, monosacáridos que no se presentaron en el guisante crudo. Después de 30 minutos de incubación con α -galactosidasa comercial, disminuyó el contenido en rafinosa (57%), estaquiosa (75%) y verbascosa (89%), no se modificaron significativamente ($P \leq 0,05$) los niveles de sacarosa y aumentaron los de fructosa, glucosa y galactosa. A los 60 minutos de incubación se observó un mayor descenso en estaquiosa (83%) y verbascosa (93%). Los niveles de rafinosa, sacarosa y fructosa no mostraron cambios significativos ($P \leq 0,05$), mientras que disminuyó ligeramente el contenido en glucosa y aumentó ligeramente el de galactosa. Cuando el proceso se prolongó durante 90 minutos disminuyó aún más los niveles de estaquiosa (91%) y verbascosa (95%) y no se modificaron significativamente ($P \leq 0,05$) los niveles de rafinosa, sacarosa y galactosa. Se observó, sin embargo, un notable aumento en el contenido en fructosa y glucosa. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó 90 minutos como tiempo óptimo de actuación de la α -galactosidasa comercial, debido a que las harinas funcionales de guisantes obtenidas tienen un menor contenido en α -galactósidos y un mayor contenido en carbohidratos solubles disponibles.

3.3.1.2. Optimización del proceso de actuación de α -galactosidasas en harinas de lentejas

Los carbohidratos solubles que contienen las lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela) son: sacarosa (1,62%) y los α -galactósidos rafinosa (0,44%), ciceritol (1,52%), estaquiosa (2,85%) y verbascosa (0,65%). El contenido en almidón total y disponible es de 39,91% y 35,65%, respectivamente, y el de carbohidratos disponibles totales es de 37,26% (suma de almidón disponible y el total de carbohidratos solubles disponibles). Se observaron niveles de tiamina de 0,32 mg/100g s.s. y de riboflavina de 0,33 mg/100g s.s. Se detectó la presencia de

inositol hexafosfato (IP_6) (0,27%), inositol pentafofato (IP_5) (0,08%), inositol tetrafofato (IP_4) (0,05%) e inositol trifosfato (IP_3) (0,03%). La actividad inhibidora de tripsina en las lentejas fue de 3,82 TIU/mg s.s. (Tablas 23 y 24).

a) Efecto de la acción de la α -galactosidasa endógena las harinas de lentejas

La cinética de actuación de la α -galactosidasa endógena sobre el contenido en monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), disacáridos (sacarosa) y α -galactósidos (rafinosa, ciceritol, estaquiosa y verbascosa) de las harinas de lentejas se encuentra recogido en la Tabla 19 y Gráficos 3a y 3b.

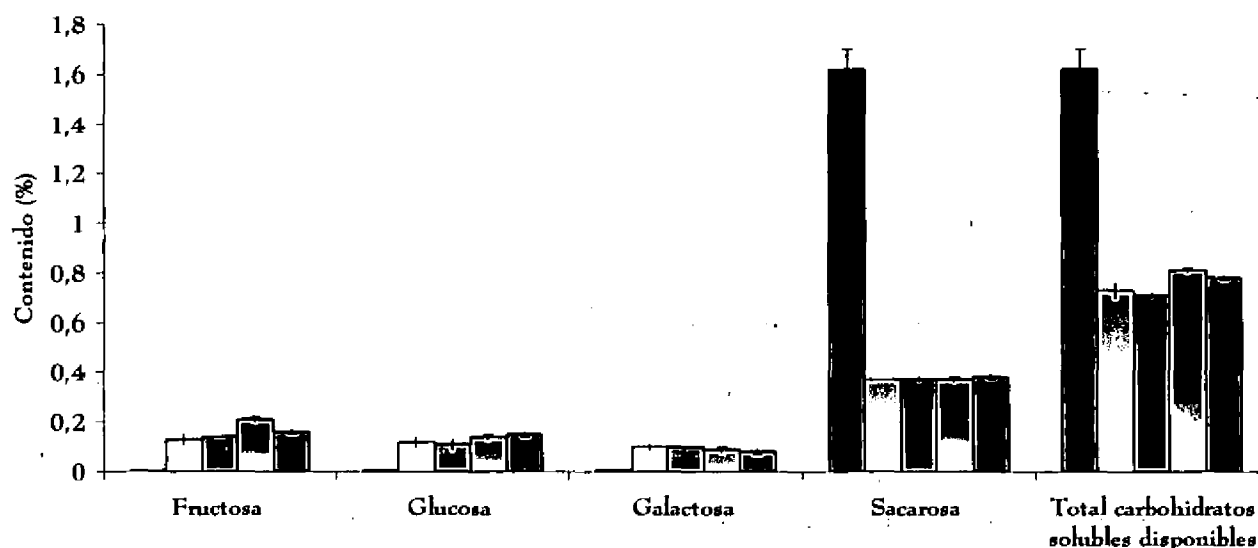
Tabla 19. Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa endógena en el contenido de carbohidratos solubles de lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela)*

Lentejas	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Rafinosa	Ciceritol	Estaquiosa	Verbascosa	Total α -galactósidos
Crudas	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,62 \pm 0,08 ^b	0,44 \pm 0,04 ^c	1,52 \pm 0,08 ^b	2,85 \pm 0,07 ^e	0,65 \pm 0,02 ^b	5,45 \pm 0,15 ^e
15 minutos	0,13 \pm 0,02 ^b	0,12 \pm 0,02 ^b	0,10 \pm 0,01 ^c	0,37 \pm 0,00 ^a	0,12 \pm 0,02 ^b	0,32 \pm 0,02 ^a	0,68 \pm 0,02 ^d	ND ^a	1,12 \pm 0,03 ^d
30 minutos	0,14 \pm 0,00 ^b	0,11 \pm 0,02 ^b	0,10 \pm 0,00 ^c	0,37 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,01 ^{ab}	0,32 \pm 0,01 ^a	0,61 \pm 0,01 ^c	ND ^a	1,04 \pm 0,01 ^c
60 minutos	0,21 \pm 0,01 ^d	0,14 \pm 0,01 ^c	0,09 \pm 0,01 ^b	0,37 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,32 \pm 0,00 ^a	0,58 \pm 0,01 ^b	ND ^a	1,00 \pm 0,01 ^b
90 minutos	0,16 \pm 0,01 ^c	0,15 \pm 0,01 ^d	0,08 \pm 0,01 ^b	0,38 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,31 \pm 0,01 ^a	0,53 \pm 0,01 ^a	ND ^a	0,94 \pm 0,02 ^a

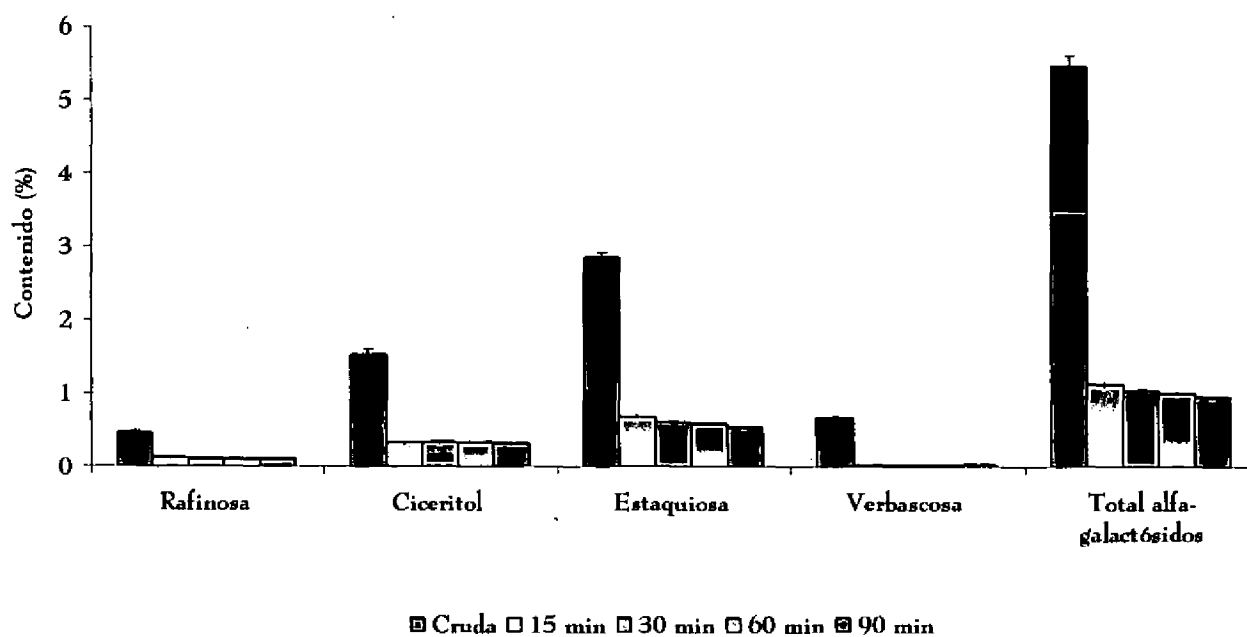
* (g/100g s.s.). Valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones. ND=No detectado. El mismo superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P < 0,05$).

Gráfico 3: Cinética sobre la actuación de la α -galactosidasa endógena en el contenido de carbohidratos solubles de lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela) por la acción de α -galactosidasa endógena.

a) Carbohidratos solubles disponibles



b) α -Galactósidos



En las harinas de lenteja incubadas durante 15 minutos con la α -galactosidasa endógena, el contenido en α -galactósidos descendió drásticamente: rafinosa un 73%, ciceritol un 79%, estaquiosa un 76%, y se observó la total desaparición de verbascosa. Los niveles de sacarosa también se redujeron en un 77% y se detectó la presencia de fructosa, glucosa y galactosa, monosacáridos que no se detectaron en la semilla cruda. Cuando el periodo de incubación se prolongó hasta 60 minutos el contenido en fructosa y glucosa aumentó mientras que el de estaquiosa disminuyó significativamente ($P \leq 0,05$), descenso que fue más acusado a los 90 minutos (81%).

La cinética de actuación de la α -galactosidasa comercial sobre el contenido en monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), disacáridos (sacarosa) y α -galactósidos (rafinosa, ciceritol, estaquiosa y verbascosa) de la harina de lentejas se encuentra recogido en la Tabla 20 y Gráficos 4a y 4b. En este proceso actuará en las harinas de guisante tanto la α -galactosidasa endógena como la comercial.

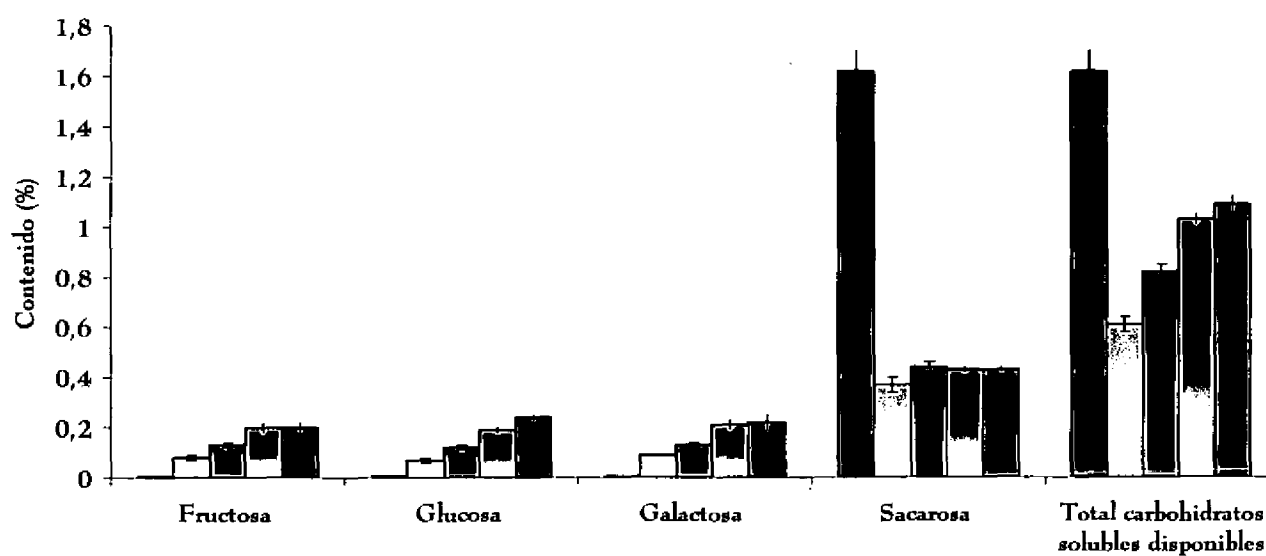
Tabla 20. Cinética sobre la adición de α -galactosidasa comercial en el contenido de carbohidratos solubles de lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela)*.

Lentejas	Fructosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Rafinosa	Ciceritol	Estaquiosa	Verbascosa	Total α -galactósidos
Crudas	ND ^a	ND ^a	ND ^a	1,62 \pm 0,08 ^e	0,44 \pm 0,04 ^d	1,52 \pm 0,08 ^e	2,85 \pm 0,07 ^b	0,65 \pm 0,02 ^b	5,45 \pm 0,15 ^d
15 minutos	0,08 \pm 0,01 ^b	0,07 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,00 ^b	0,37 \pm 0,03 ^a	0,17 \pm 0,01 ^b	0,36 \pm 0,04 ^b	0,56 \pm 0,01 ^e	ND ^a	1,09 \pm 0,03 ^e
30 minutos	0,13 \pm 0,01 ^c	0,12 \pm 0,01 ^c	0,13 \pm 0,01 ^c	0,44 \pm 0,02 ^b	0,24 \pm 0,01 ^c	0,38 \pm 0,03 ^b	0,48 \pm 0,02 ^b	ND ^a	1,10 \pm 0,03 ^e
60 minutos	0,20 \pm 0,02 ^d	0,19 \pm 0,01 ^d	0,21 \pm 0,02 ^d	0,43 \pm 0,01 ^b	0,24 \pm 0,03 ^c	0,32 \pm 0,03 ^a	0,42 \pm 0,01 ^a	ND ^a	0,99 \pm 0,02 ^b
90 minutos	0,20 \pm 0,02 ^d	0,24 \pm 0,01 ^e	0,22 \pm 0,03 ^d	0,43 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,02 ^a	0,33 \pm 0,01 ^a	0,42 \pm 0,01 ^a	ND ^a	0,89 \pm 0,01 ^a

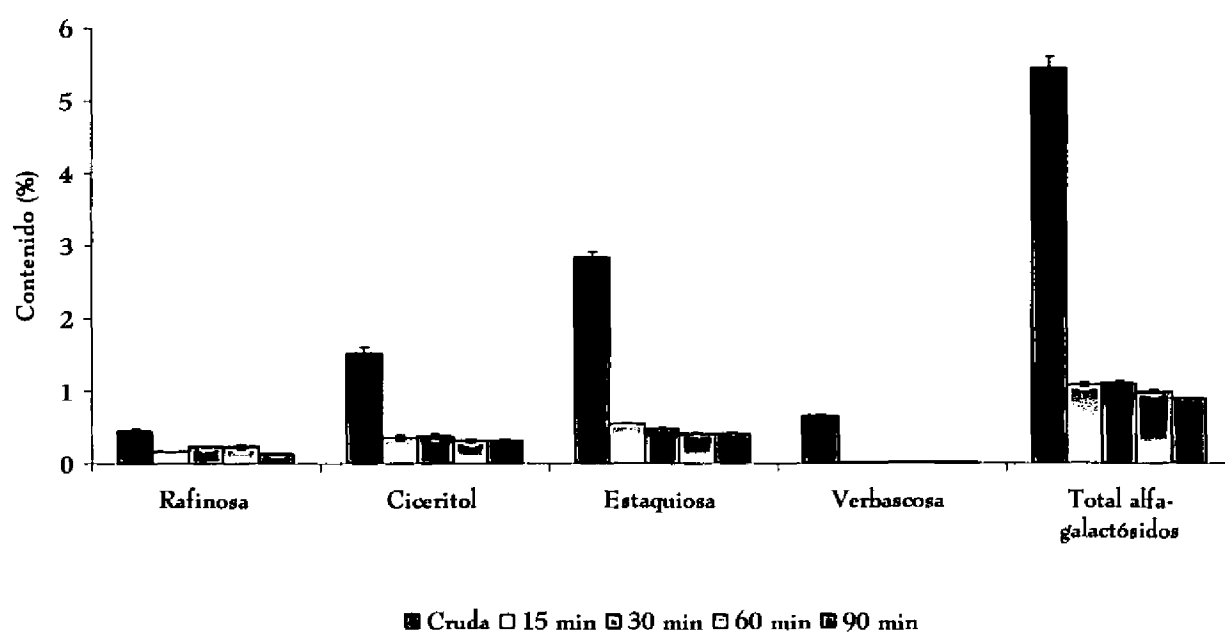
* (g/100g s.s.). Valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones. ND=No detectado. El mismo superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P\leq 0,05$).

Gráfico 4: Cinética sobre la adición de α -galactosidasa comercial en el contenido de carbohidratos solubles de lenteja (*Lens esculenta* var. Ángela).

a) Carbohidratos solubles disponibles



b) α -Galactósidos



Después de 15 minutos de incubación con la α -galactosidasa comercial, los niveles de los α -galactósidos descendieron notablemente. La rafinosa se redujo en un 61%, el ciceritol en un 76%, la estaquiosa en un 80% y la verbascosa desapareció totalmente. La sacarosa descendió también un 77% y se detectó la presencia de fructosa, glucosa y galactosa, monosacáridos ausentes en la lenteja cruda. Después de 30 minutos de incubación no se modificó significativamente el contenido en ciceritol y sacarosa, descendió un 83% la estaquiosa y aumentó ligeramente el contenido en rafinosa. Trascurrido 90 minutos el contenido en fructosa, glucosa y galactosa aumentó significativamente ($P \leq 0,05$), el de sacarosa, ciceritol y estaquiosa no se modificó, mientras que el de rafinosa descendió (68%). Se seleccionó 90 minutos como tiempo de actuación óptimo de la α -galactosidasa comercial, debido a que las harinas funcionales de lentejas obtenidas tienen un menor contenido en α -galactósidos y un mayor contenido en carbohidratos solubles disponibles (Gráfico 4).

3.3.2. Valoración de harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas en óptimas condiciones de actuación de enzimas

Se han obtenido, bien por nosotros o por distintos grupos de investigación como se ha indicado en el apartado 3.1.2.1, harinas funcionales de guisantes y lentejas utilizando los siguientes criterios de optimización.

- ♦ Harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas por actuación de α -galactosidasas: se optimizaron en base a un menor contenido en α -galactósidos.
- ♦ Harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas por actuación de fitasas: se optimizaron en base a un menor contenido en inositol hexafosfato.
- ♦ Harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas por actuación de tanasas: se optimizaron en base a un mayor contenido en ácido gálico.

- Harinas funcionales de guisantes obtenidas por actuación de enzimas que actúan sobre los componentes de la pared celular: se optimizaron en base a conseguir la relación ideal de fibra insoluble/fibra soluble de 2/1.

Por otra parte, también se han obtenido harinas funcionales de guisantes mediante la actuación de enzimas endógenas durante 60 min, 90 min, 120 min y 18 h, periodos de tiempo óptimos para las harinas obtenidas mediante la adición de las enzimas comerciales fitasa, α -galactosidasa, tanasa y viscozyme, respectivamente, así como harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la actuación de enzimas endógenas durante 60 min y 90 min, periodos de tiempo óptimos para las harinas obtenidas mediante la adición de las enzimas comerciales fitasa y α -galactosidasa.

En las harinas funcionales de guisantes y lentejas se analizó el contenido en carbohidratos solubles disponibles (monosacáridos y disacáridos), almidón total y disponible, vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina) y en los factores antinutritivos, α -galactósidos, inositol fosfatos y actividad inhibidora de tripsina.

En las Tablas 21 y 22 se recogen los valores en nutrientes y en factores antinutritivos de guisantes crudos y de las harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la acción de enzimas endógenas (durante un tiempo de actuación de 60 min, 90 min, 120 min y 18 h) y mediante la adición de las enzimas comerciales α -galactosidasas, fitasas, tanasas y las que actúan sobre los componentes de la pared celular (viscozyme).

Los códigos para designar las muestras en las tablas son las siguientes:

- G: guisantes crudos.
- GE60: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la acción de enzimas endógenas durante 60 minutos.

- ♦ GF60: harinas de guisantes obtenidas mediante la adición de fitasa comercial durante 60 minutos.
- ♦ GE90: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la acción de enzimas endógenas durante 90 minutos.
- ♦ GG90: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la adición de α -galactosidasa comercial durante 90 minutos.
- ♦ GE120: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la acción de enzimas endógenas durante 120 minutos.
- ♦ GT120: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la adición de tanasa comercial durante 120 minutos.
- ♦ GE18: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la acción de enzimas endógenas durante 18 horas.
- ♦ GT18: harinas de guisantes obtenidas mediante la adición de viscozyme comercial durante 18 horas.

Los datos de las Tablas 21-22 son los valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones; ND= No detectado. Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

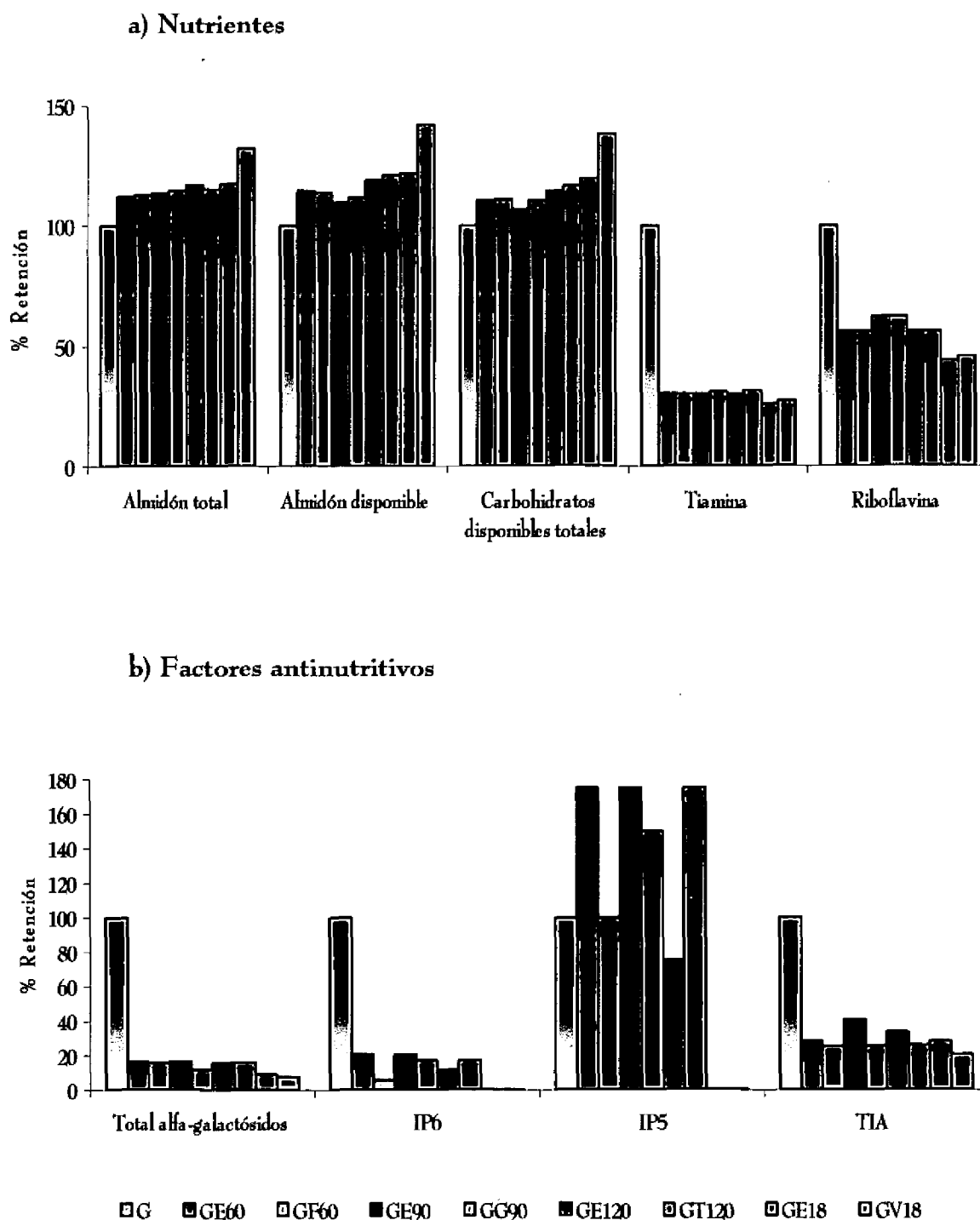
Tabla 21. Contenido en nutrientes de harinas de guisantes (*Pisum sativum* var. Elsa) obtenidas en condiciones óptimas de actuación de enzimas.

Nutrientes	G	GE60	GF60	GE90	GG90	GE120	GT120	GE18	GV18
Fructosa (g/100 g s.s.)	ND*	ND*	0,08±0,01*	0,05±0,01 ^d	0,35±0,00 ^f	0,02±0,00 ^b	0,03±0,00 ^c	ND*	ND*
Glucosa (g/100 g s.s.)	ND*	0,06±0,01 ^d	0,16±0,01*	0,16±0,02*	0,34±0,01 ^f	0,03±0,00 ^c	0,02±0,00 ^b	ND*	ND*
Galactosa (g/100 g s.s.)	ND*	ND*	0,12±0,01 ^d	0,16±0,00*	0,20±0,01 ^f	0,04±0,00 ^b	0,06±0,01 ^c	0,76±0,02 ^b	0,62±0,02*
Sacarosa (g/100 g s.s.)	1,73±0,09*	0,32±0,01 ^b	0,38±0,02*	0,33±0,01 ^b	0,63±0,00 ^d	0,26±0,02*	0,23±0,01*	0,42±0,01 ^c	0,32±0,01 ^b
Almidón total (g/100 g s.s.)	42,65±0,58*	47,94±0,48 ^b	48,09±0,10 ^b	48,44±0,30 ^{bc}	48,91±0,70 ^{cd}	49,92±0,42 ^{cd}	49,15±1,29 ^{cd}	50,07±1,42*	56,37±1,06 ^f
Almidón disponible (g/100 g s.s.)	38,70±1,21*	44,34±0,78*	44,11±0,66*	42,54±0,33 ^b	43,22±0,54 ^b	45,98±0,25 ^d	46,86±1,28*	47,20±0,23*	54,95±0,59 ^f
Carbohidratos Disponibles totales (g/100 g s.s.)	40,44±0,97*	44,72±0,68*	44,85±0,30*	43,24±0,27 ^b	44,73±0,44*	46,34±0,14 ^d	47,21±0,64*	48,38±0,15 ^f	55,89±0,32*
Tiamina (mg/100 g s.s.)	0,73±0,01 ^d	0,22±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,22±0,01 ^{bc}	0,23±0,01 ^{bc}	0,22±0,08 ^{bc}	0,23±0,02*	0,19±0,01*	0,20±0,02*
Riboflavina (mg/100 g s.s.)	0,15±0,01 ^d	0,09±0,01 ^b	0,09±0,02 ^{bc}	0,10±0,01 ^{bc}	0,10±0,01 ^{bc}	0,09±0,01 ^b	0,09±0,01 ^b	0,06±0,002*	0,07±0,01*

Tabla 22. Contenido en factores antinutritivos de harinas de guisantes (*Pisum sativum* var. Esia) obtenidas en condiciones óptimas de actuación de enzimas.

Factores antinutritivos	G	GE60	GF60	GE90	GG90	GE120	GT120	GE18	GV18
Rafinosa (g/100g s.s.)	0,56±0,02 ⁱ	0,15±0,01 ^d	0,12±0,01 ^e	0,12±0,01 ^e	0,29±0,01 ^e	0,12±0,01 ^{bc}	0,10±0,01 ^b	ND ^a	ND ^a
Estaguiosa (g/100g s.s.)	2,24±0,07 ⁱ	0,45±0,01 ^d	0,43±0,02 ^{cd}	0,52±0,01 ^e	0,21±0,01 ^e	0,40±0,02 ^{bc}	0,38±0,01 ^b	0,47±0,01 ^d	0,40±0,00 ^{bc}
Verbascoza (g/100g s.s.)	2,39±0,07 ⁱ	0,26±0,01 ^e	0,27±0,01 ^e	0,24±0,03 ^e	0,12±0,00 ^b	0,32±0,01 ^d	0,35±0,01 ^e	ND ^a	ND ^a
Total α-galactósidos (g/100g s.s.)	5,19±0,07 ⁱ	0,86±0,01 ^e	0,83±0,01 ^d	0,87±0,01 ^e	0,62±0,02 ^e	0,85±0,04 ^{de}	0,83±0,03 ^d	0,47±0,01 ^b	0,40±0,01 ^e
Inositol hexafosfato (g/100g s.s.)	0,34±0,01 ⁱ	0,07±0,00 ^e	0,02±0,00 ^b	0,07±0,00 ^e	0,06±0,00 ^f	0,04±0,01 ^e	0,06±0,01 ^d	ND ^a	ND ^a
Inositol pentafofato (g/100g s.s.)	0,04±0,00 ^e	0,07±0,00 ^{de}	0,04±0,00 ^e	0,07±0,02 ^e	0,06±0,00 ^d	0,03±0,01 ^b	0,07±0,01 ^{de}	ND ^a	ND ^a
Inositol tetrafosfato (g/100g s.s.)	ND ^a	0,07±0,00 ^e	0,05±0,01 ^d	0,07±0,00 ^e	0,03±0,00 ^{bc}	0,02±0,01 ^b	0,05±0,01 ^d	ND ^a	ND ^a
Inositol trifosfato (g/100g s.s.)	ND ^a	ND ^a	0,05±0,00 ^d	ND ^a	0,01±0,00 ^b	ND ^a	0,02±0,01 ^{bc}	ND ^a	ND ^a
Total inositol fosfatos (g/100g s.s.)	0,38±0,01 ⁱ	0,21±0,00 ^e	0,17±0,01 ^e	0,21±0,00 ^e	0,16±0,01 ^e	0,09±0,01 ^b	0,19±0,01 ^d	ND ^a	ND ^a
TIA (TIU/mg s.s.)	8,69±0,02 ^e	2,45±0,07 ^d	2,20±0,02 ^b	3,51±0,01 ^f	2,22±0,01 ^{bc}	2,93±0,12 ^e	2,25±0,01 ^e	2,47±0,01 ^d	1,78±0,01 ^e

Gráfico 5: Retención de nutrientes y factores antinutritivos en harinas funcionales de guisantes (*Pisum sativum* var. Esla)



En las harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante actuación enzimática se observaron cambios considerables en los nutrientes y en los factores antinutritivos estudiados.

El contenido en sacarosa de los guisantes disminuyó en todas las harinas funcionales apareciendo los monosacáridos fructosa, glucosa y galactosa, como consecuencia de la hidrólisis de los disacáridos y α -galactósidos producida por la actuación de enzimas endógenas o de enzimas comerciales.

El contenido en almidón total fue más elevado en las harinas funcionales que en el guisante crudo. Se observaron incrementos que oscilaron entre 12%-17%, con excepción de las harinas funcionales obtenidas mediante la adición de viscozyme, donde el aumento fue del 32%. El contenido en almidón disponible también fue superior en las harinas funcionales que en los guisantes crudos, oscilando el incremento entre 10-14% en las harinas optimizadas con la adición de α -galactosidasas y fitasas, mientras que en las obtenidas con tanasas o mediante la actuación de enzimas endógenos durante 120 min y 18 h el incremento fue del 20%, llegando hasta el 42% cuando se añadió la enzima viscozyme.

El contenido de tiamina descendió en todas las harinas funcionales (~70%). Similar comportamiento se observó para la riboflavina (~40%), siendo más acusado en las harinas funcionales obtenidas a las 18 h de actuación enzimática (56% para GE18 y 62% para GV18).

En las harinas funcionales de guisantes se observó una reducción muy drástica en los factores antinutritivos (α -galactósidos, inositol hexafosfato y actividad inhibidora de tripsina), independientemente del proceso enzimático llevado a cabo (Tabla 22 y Gráfico 5b). El descenso del contenido total de α -galactósidos (83%-92%) se incrementó al aumentar el tiempo de incubación

enzimática, excepto cuando se adicionó α -galactosidasa comercial, donde se necesitó un periodo de tiempo menor para hidrolizar los α -galactósidos.

Con respecto al descenso en el contenido en inositol hexafosfato se observó que la hidrólisis del IP₆ (80%) era muy similar en todas las harinas funcionales de guisantes, excepto cuando se adicionó fitasa comercial, donde el descenso llegó al 94%, y se eliminó completamente cuando el tiempo de incubación enzimática se prolongó a 18 h (Tabla 22, Gráfico 5b).

La actividad inhibidora de tripsina (TIA) se redujo considerablemente en todas las harinas funcionales de guisantes (~70%) (Tabla 22, Gráfico 5b).

En las Tablas 23 y 24 se recoge el contenido en nutrientes y en factores antinutritivos de lentejas crudas y de las harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas.

Los códigos de las muestras que se utilizan en las tablas son las siguientes:

- ♦ L: lentejas crudas.
- ♦ LE60: harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la acción de fitasa endógena durante 60 minutos.
- ♦ LF60: harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la adición de fitasa comercial durante 60 minutos.
- ♦ LE90: harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la acción de α -galactosidasa endógena durante 90 minutos.
- ♦ LG90: harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la adición de α -galactosidasa comercial durante 90 minutos.
- ♦ LT120: harinas funcionales de lentejas obtenidas mediante la adición de fitasa comercial durante 120 minutos.

Los datos de las Tablas 23-24 son los valores medios \pm desviación estándar de 4 determinaciones; ND= No detectado. Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

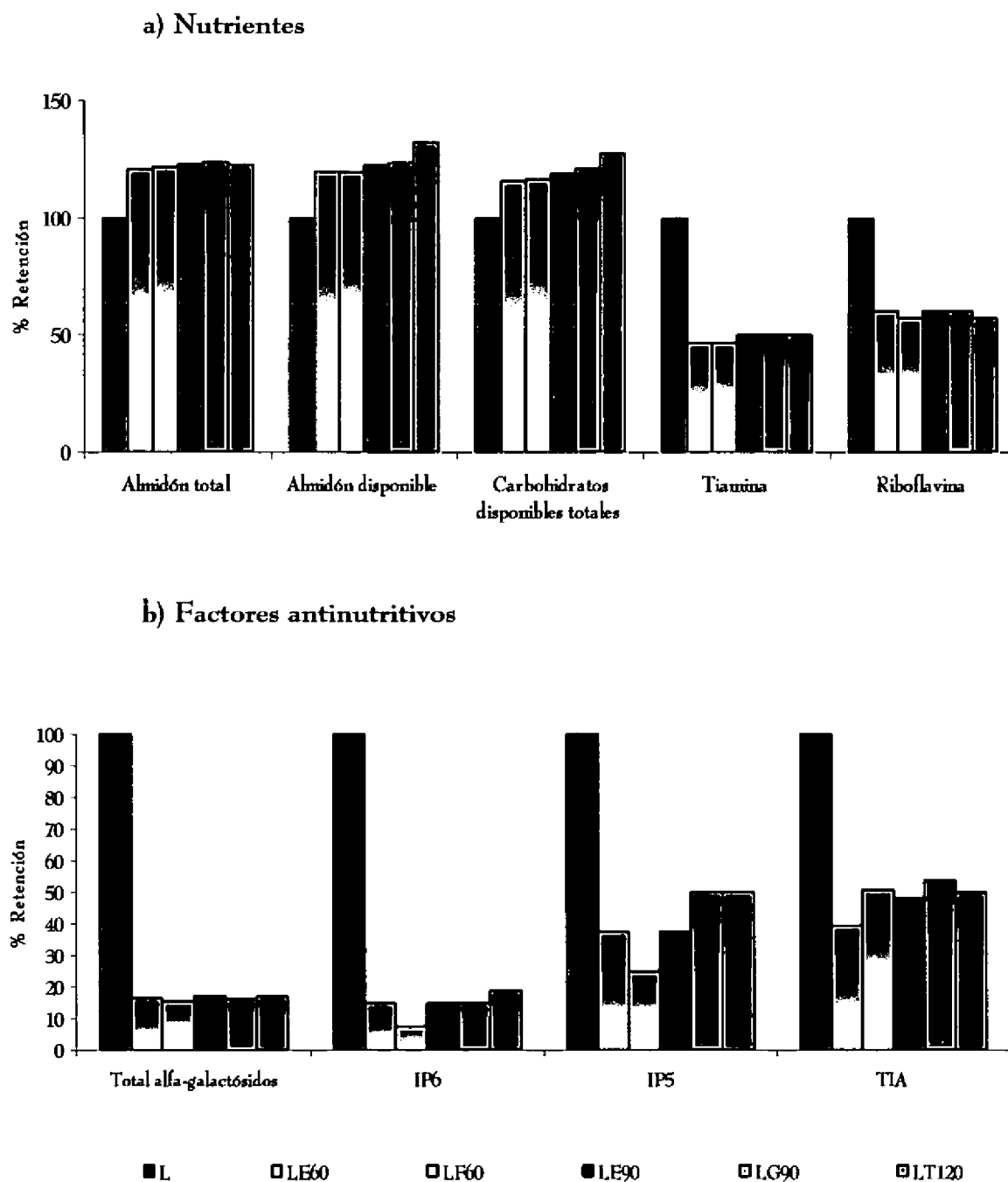
Tabla 23. Contenido en nutrientes de harinas de lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela) obtenidas en condiciones óptimas de actuación de enzimas.

Nutrientes	L	LE60	LF60	LE90	LG90	LT120
Fructosa	ND ^a	0,05±0,01 ^b	0,21±0,01 ^e	0,16±0,01 ^d	0,20±0,02 ^e	0,10±0,02 ^c
Glucosa	ND ^a	0,10±0,02 ^b	0,27±0,01 ^f	0,15±0,01 ^d	0,24±0,01 ^e	0,12±0,01 ^c
Galactosa	ND ^a	ND ^a	0,09±0,00 ^c	0,08±0,01 ^c	0,22±0,03 ^d	0,05±0,01 ^b
Sacarosa	1,62±0,08 ^d	0,16±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,38±0,01 ^b	0,43±0,01 ^c	0,16±0,01 ^a
Almidón total (g/100 g s.s.)	39,91±0,60 ^a	48,18±0,65 ^b	48,58±0,69 ^b	49,16±0,44 ^c	49,40±0,18 ^c	49,02±1,07 ^{bc}
Almidón disponible (g/100 g s.s.)	35,65±0,53 ^a	42,70±0,72 ^b	42,61±0,52 ^b	43,74±0,44 ^c	44,09±0,73 ^c	47,11±1,03 ^d
Carbohidratos Disponibles totales (g/100 g s.s.)	37,26±0,28 ^a	43,08±0,62 ^b	43,35±0,24 ^b	44,32±0,58 ^c	45,18±0,61 ^d	47,54±0,61 ^e
Tiamina (mg/100 g s.s.)	0,32±0,03 ^c	0,15±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	0,16±0,01 ^{ab}	0,16±0,01 ^{ab}	0,16±0,01 ^{ab}
Riboflavina (mg/100 g s.s.)	0,33±0,01 ^b	0,20±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a	0,20±0,01 ^a	0,20±0,03 ^a	0,19±0,01 ^a

Tabla 24. Contenido en factores antinutritivos de harinas lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela) obtenidas en condiciones óptimas de actuación de enzimas.

Factores antinutritivos	L	LE60	LF60	LE90	LG90	LT120
Rafinosa (g/100g s.s.)	0,44±0,04 ^a	0,05±0,00 ^a	0,10±0,01 ^b	0,10±0,01 ^b	0,14±0,02 ^c	0,17±0,01 ^d
Ciceritol (g/ 100g s.s.)	1,52±0,08 ^c	0,36±0,01 ^b	0,32±0,01 ^a	0,31±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,30±0,05 ^a
Estaquiosa (g/100g s.s.)	2,85±0,07 ^e	0,48±0,01 ^c	0,44±0,01 ^b	0,53±0,01 ^d	0,42±0,01 ^a	0,42±0,08 ^a
Verbascosa (g/100g s.s.)	0,65±0,02 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Total α-galactósidos (g/100g s.s.)	5,45±0,15 ^d	0,90±0,02 ^{bc}	0,85±0,01 ^a	0,94±0,02 ^c	0,89±0,01 ^b	0,89±0,07 ^{ab}
Inositol hexafosfato (g/100g s.s.)	0,27±0,01 ^d	0,04±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,05±0,01 ^b
Inositol pentafosfato (g/100g s.s.)	0,08±0,00 ^d	0,03±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,04±0,00 ^c	0,04±0,01 ^{bc}
Inositol tetrafosfato (g/100g s.s.)	0,05±0,00 ^d	0,04±0,00 ^c	0,03±0,00 ^b	0,04±0,00 ^c	0,02±0,00 ^a	0,04±0,01 ^c
Inositol trifosfato (g/100g s.s.)	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,01 ^{ab}
Total inositol fosfatos (g/100g s.s.)	0,42±0,01 ^f	0,14±0,01 ^d	0,11±0,00 ^a	0,13±0,01 ^c	0,12±0,00 ^b	0,19±0,02 ^c
TIA (TIU/mg s.s.)	3,82±0,08 ^f	1,50±0,02 ^a	1,94±0,00 ^d	1,84±0,07 ^b	2,05±0,11 ^e	1,90±0,01 ^c

Gráfico 6: Retención de nutrientes y factores antinutritivos en harinas funcionales de lentejas (*Lens esculenta* var. Ángela).



En las harinas funcionales de lentejas se observan, como en el caso de los guisantes, modificaciones en el contenido en nutrientes y factores antinutritivos.

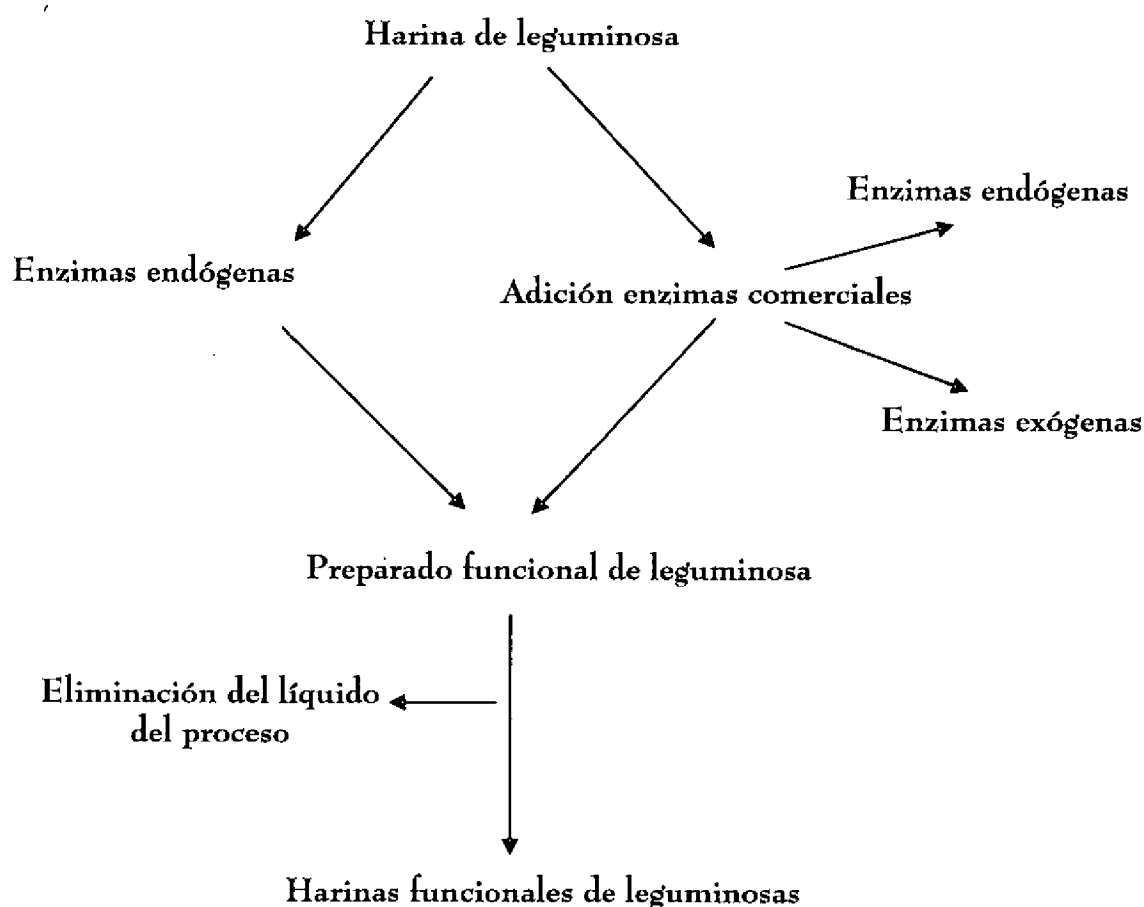
El contenido en almidón total y disponible de las harinas funcionales de lentejas es mayor que en las lentejas crudas (21%-24% y 20%-32%, respectivamente). Los niveles de carbohidratos disponibles totales aumentaron en las harinas funcionales de lentejas (16%-28%) mientras que los de tiamina y riboflavina descendieron (50% y 60%, respectivamente).

Como se puede observar, se produjo una reducción muy drástica de los factores antinutritivos estudiados (α -galactósidos, inositol hexafosfato e inhibidores de tripsina) en las harinas funcionales de lentejas, independientemente del proceso de actuación enzimática (Tabla 24 y Gráfico 6b). El contenido en α -galactósidos descendió (84%) de forma similar entre las distintas harinas funcionales de lentejas obtenidas. La disminución del contenido en inositol hexafosfato (IP₆) fue muy parecido en las harinas funcionales de lentejas (~85%), excepto cuando se adicionó fitasa, donde la hidrólisis de dicho compuesto fue mayor (93%). Por último, la actividad inhibidora de tripsina se redujo entre 50%-60%.

La adición de enzimas es una práctica cada vez más frecuente en la industria alimentaria. Por lo general, por motivos económicos, se utilizan cócteles enzimáticos cuya especificidad no es tan concreta como las enzimas puras. Por otra parte, incluso cuando se utilizan enzimas puras, se pueden producir efectos colaterales debido a que su purificación no es total. En el presente trabajo se utilizaron enzimas comerciales con actividad específica sobre los factores antinutritivos objeto de estudio (α -galactosidasa, fitasa, tanasa) y en el caso del guisante, sobre los componentes de la pared celular de los vegetales. También se realizaron incubaciones en las mismas condiciones en las que se obtuvieron las

harinas funcionales anteriores, pero sin adicionar enzimas, con la finalidad de conocer la actuación de las enzimas endógenas.

Con objeto de comprender mejor los mecanismos que han tenido lugar en la obtención de las harinas funcionales, representamos el proceso en el siguiente esquema.



En las harinas funcionales se han podido producir los siguientes efectos:

- a) Hidrólisis de compuestos de las leguminosas crudas debido a la actuación de enzimas endógenas y/o del enzima comercial añadido.
- b) Eliminación de compuestos que sean solubles en los líquidos del proceso.

- c) Concentración porcentual de compuestos como consecuencia de la reducción de otros compuestos de la leguminosa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran un gran descenso del contenido en α -galactósidos en todas las harinas funcionales de leguminosas obtenidas después de la actuación enzimática. La α -galactosidasa es la enzima responsable de la hidrólisis de los enlaces α -(1-6) entre moléculas de galactosa en los α -galactósidos, dando lugar a formas libres de este monosacárido y α -galactósidos de cadena más corta. En las harinas funcionales de leguminosas se ha observado una correlación negativa ($P \leq 0,05$) entre galactosa y verbascosa ($r = -0,74$) y galactosa y estaquiosa ($r = -0,85$), y en lentejas entre galactosa y ciceritol ($r = -0,59$). Los incrementos en los niveles de sacarosa pueden ser consecuencia de la hidrólisis de la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, y este disacárido a su vez podría haberse hidrolizado a glucosa y fructosa gracias a otras enzimas endógenas presentes en las semillas de leguminosas, como invertasas, que se hubieran activado durante la incubación de la harina en las condiciones utilizadas.

La reducción tan drástica del contenido en α -galactósidos, inositol hexafosfato o inhibidores de tripsina en las harinas funcionales de guisantes o de lentejas se podría deber en parte a la actuación de las enzimas α -galactosidasa endógena y/o comercial, fitasa endógena y/o comercial ó peptidasas endógenas así como a la solubilización de dichos compuestos en el líquido del proceso, el cual fue eliminado.

El aumento porcentual observado en las harinas funcionales de leguminosas en los niveles de almidón (total y disponible), puede ser consecuencia de la disminución de otros constituyentes presentes en las harinas y que se

hubieran eliminado con el líquido de remojo, o se puede deber en parte a que la actuación enzimática llevada a cabo produzca rupturas de la matriz del alimento que permita un mayor acceso al almidón y, de ahí, su mayor cuantificación. Este hecho se pone claramente de manifiesto en las harinas de guisante obtenidas con viscozyme, que actúa sobre los componentes de la pared celular, produciéndose un aumento considerable del contenido tanto en almidón total como disponible.

Los cambios observados en el contenido en tiamina y riboflavina se pueden deber a que son vitaminas hidrosolubles que se pueden haber eliminado con el líquido del proceso.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las harinas funcionales de guisantes y lentejas (Tablas 21-24, Gráficos 5-6), observamos que la reducción de factores antinutritivos se obtiene no sólo mediante la adición de la enzima correspondiente, sino que las propias enzimas endógenas de la semilla producen efectos muy similares. Este hecho es necesario resaltarlo desde el punto de vista económico, ya que para obtener harinas funcionales con un bajo contenido en α -galactósidos, inositol hexafosfato o actividad inhibidora de tripsina, bastaría con la actuación de las enzimas endógenas de la semilla.

3.4. Discusión sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas

En las semillas de guisantes y lentejas crudas estudiadas se detectó la presencia de los carbohidratos solubles sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa. En las lentejas, se detectó además la presencia de ciceritol, trisacárido ausente en las semillas de guisantes. Por otro lado, en estas leguminosas secas no se detectó la presencia de monosacáridos. El contenido obtenido en dichos carbohidratos solubles, tanto en guisantes como en lentejas, son similares a los encontrados en

la bibliografía por otros autores (Reddy y col., 1984; Vidal-Valverde y col., 1992b, 1993b; Frías y col., 1999; Vidal-Valverde y col., 2002).

La adición de α -galactosidasa de diferente origen para su uso en la industria alimentaria, es utilizada con éxito para hidrolizar los azúcares con alto contenido en rafinosa responsables de la flatulencia, y para la producción de sacarosa en remolacha azucarera (Wong-Leun y col., 1995). Varios autores han puesto de manifiesto que el uso de distintas α -galactosidasas extraídas y purificadas de *Aspergillus saitoi* (Sugimoto y van Buren, 1970), *Cladosporium cladosporioides* (Fres.), *Aspergillus oryzae* (Cruz y Park, 1982, Khare y col., 1994) y otras enzimas microbianas (Cruz y col., 1981) es viable para obtener leche de soja libre de azúcares flatulentos. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de las endo/exo α -galactosidasas en otras leguminosas. Somiari y Bálogh (1995) usaron una α -galactosidasa extraída de *Aspergillus niger* en harina de cowpea (*Vigna unguiculata*) durante 2 horas a 50°C consiguiendo una reducción de un 82% y 93% en estaquiosa y verbascosa, respectivamente, siendo este descenso sensiblemente menor (4% y 8%, respectivamente) en la harina control durante el ensayo sin la adición de la enzima. Mansour y Khalil (1998) estudiaron el efecto de las α -galactosidasas de *C. cladosporioides*, *A. oryzae* y *A. niger* en la reducción de los α -galactósidos en harina de garbanzo. En todos los casos se consiguió eliminar casi al 100% el contenido en rafinosa y estaquiosa, y significativamente más eficaces que con la única presencia de la α -galactosidasa endógena. Mulimani y col. (1997) observaron cómo se producía la degradación de los oligosacáridos α -galactósidos en harina de soja en presencia de una α -galactosidasa extraída de semillas de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), y publicaron que mientras que la reducción de los niveles de estaquiosa fue de un 90% y de rafinosa de un 92%, en la harina con la α -galactosidasa endógena este descenso fue notablemente inferior: del 8,5% para estaquiosa y del 6,2% para rafinosa. De

modo similar, Slominski (1994) consiguió reducir el contenido en estaquiosa en soja (65%) utilizando una α -galactosidasa comercial.

Sin embargo, a la vista de los resultados que hemos obtenido en las harinas funcionales de guisantes y lentejas, la α -galactosidasa endógena, propia de la semilla, jugó un papel importante en la reducción de los α -galactósidos en todas las harinas funcionales obtenidas debido, probablemente, a las condiciones utilizadas en el proceso (37°C, pH 5,5). Varios autores han descrito las características de estabilidad enzimática de la α -galactosidasa endógena en lenteja (Dey y col., 1984), judía de ojo negro (*Vigna unguiculata*) (Alani y col., 1989, 1990), judía de mungo (*Vigna radiata*) (Dey y Del Campillo, 1984), garbanzo (Mittal y Sharma, 1991) y soja (Porter y col., 1992), mostrando su máximo de actividad en el rango de pH comprendido entre 4,0-6,5 y de temperatura 35-50°C. En diferentes estudios realizados por Vidal-Valverde y col. (2002), se puso de manifiesto una gran variación en el contenido de rafinosa, ciceritol y estaquiosa cuando las lentejas se mantuvieron en remojo durante 60 minutos, posiblemente debidos a la actuación de la α -galactosidasa endógena durante el proceso. Dichos autores observaron que los descensos producidos dependían de la integridad de la semilla (entera o molida). En la fermentación natural de lentejas, Frías y col. (1997) pusieron de manifiesto que el contenido en α -galactósidos descendía bruscamente durante el tiempo empleado en la preparación de la muestra (10-40 minutos), pudiendo también ser debido a la activación de las α -galactosidasas endógenas.

En los guisantes y lentejas crudos se observó la presencia del inositol hexafosfato, ácido fítico (IP₆) (0,34% en guisantes y 0,27% en lentejas) y del inositol pentafofato IP₅ (0,04% en guisantes y 0,08% en lentejas). En las lentejas, además, se detectaron los inositol fosfatos menos fosforilados IP₄ (0,05%) e IP₃ (0,03%), ausentes en los guisantes crudos. Vidal-Valverde y col.

(2003) encontraron valores de IP_6 entre 0,26%-0,65%, de IP_5 entre 0,02%-0,18% en distintas variedades de guisantes. Por otro lado, Vidal-Valverde y col. (2002) observaron un contenido de IP_6 de 0,62% y de IP_5 de 0,04% en lentejas. Kozłowska y col. (1996) encontraron valores de inositol fosfatos en semillas de lentejas de 12,71 $\mu\text{moles/g}$ s.s. en IP_6 , 1,07 $\mu\text{moles/g}$ s.s. en IP_5 , 0,50 $\mu\text{moles/g}$ s.s. en IP_4 y 0,37 $\mu\text{moles/g}$ s.s. en IP_3 . Savage (1988) ofreció contenidos de ácido fítico que oscilaban entre 0,12%-0,81% en lentejas.

Los resultados obtenidos en las harinas funcionales de leguminosas sobre el contenido de inositol fosfatos pone de manifiesto que la actuación enzimática llevada a cabo redujo considerablemente el contenido de los inositol fosfatos más fosforilados. La fitasa es la enzima responsable de la desfosforilación de los fitatos y se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales (Konietzny y Greiner, 2002). Esta enzima actúa de forma escalonada catalizando la hidrólisis del fitato (Zyta, 1992) en inositol fosfatos menos fosforilados (IP_5 , IP_4 , IP_3 , IP_2 e IP), mio-inositol y fósforo libre (Greiner y Konietzny, 1996; Sandberg y Andlid, 2002). La adición de fitasas aisladas y purificadas de diferentes microorganismos durante el procesado de alimentos es actualmente una técnica posible y viable (Sandberg y Andlid, 2002). La adición de fitasas se propuso originalmente como un aditivo alimentario en la alimentación animal para mejorar el valor nutricional del material vegetal por la liberación de ortofosfato (Mitchell y col., 1997) y durante años se ha usado una fitasa comercial de la casa *Natuphos* como aditivo alimentario en la dieta de los cerdos bajo autorización de la Unión Europea (Simon e Igbasan, 2002). Más recientemente, se ha propuesto la adición de fitasa para reducir la contaminación por fosfatos de distintas áreas de residuos (Konietzny y Greiner, 2002). Türk y col. (1996) observaron que después de la adición de fitasa de *Aspergillus niger* a la harina de trigo durante la elaboración de pan se hidrolizaba el ácido fítico un

88%, y sólo se consiguió su hidrólisis total cuando el pH se redujo hasta 3,5. Zyta (1989) y Kiiskinen y Piironen (1990) observaron que la incorporación de fitasa a la dieta de los pollos, compuesta principalmente por proteína de soja y algodón, evitaba la suplementación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

En las harinas funcionales de leguminosas obtenidas después de la acción de las enzimas endógenas, se produjo una reducción importante del contenido en ácido fítico. Esto podría ser debido a la presencia de fitasas endógenas en las semillas que se hubieran activado como consecuencia de la suspensión de las harinas en la solución tamponada. En la bibliografía se ha descrito la presencia de fitasas endógenas en semillas de leguminosas (Sandberg y Andlid, 2002; Zyta, 1992). Alonso y col. (1998) observaron que en la incubación de harinas de 3 variedades de guisantes a 30°C durante 12 h se producía una disminución del contenido en ácido fítico entre 4,6%-5,9%. Estos autores manifestaron que esta reducción era debido a un incremento de la actividad fitásica durante el proceso. El-Adawy y col. (2000) observaron que el remojo de soja, judías y altramuza en bicarbonato sódico al 0,5% durante 9 h daba lugar a descensos en el contenido de ácido fítico. Siddhuraju y col. (2002) publicaron ligeros descensos en ácido fítico (5%) en el remojo de *Vigna radiata* a 24°C durante toda una noche, sin embargo Vidal-Valverde y col. (1998) no encontraron modificaciones en los niveles de ácido fítico durante el remojo de habas en diferentes soluciones (ácida, neutra, alcalina) durante 9 horas. Ibrahim y col. (2002) observaron que el contenido de ácido fítico en *Vigna sinensis* disminuía con el remojo a temperatura ambiente durante 8 h, 12 h y 16 h, tanto en agua como en solución de bicarbonato sódico al 0,03%, y que este descenso aumentaba con el tiempo de remojo, siendo más acusado cuando el remojo se realizaba en solución ligeramente alcalina durante 16 h. Sin embargo, Vijayakumari y col. (1998) encontraron resultados opuestos en *Vigna*, ya que las mayores reducciones de ácido fítico se produjeron durante el remojo de esta leguminosa en agua durante 6 h.

En las semillas de guisantes y lentejas crudos se observó una actividad inhibidora de tripsina de 8,69 TIU/mg s.s y 3,82 TIU/mg s.s, respectivamente. Vidal-Valverde y col. (2003) publicaron valores de la actividad inhibidora de tripsina entre 0,8-8,4 TIU/mg s.s. en distintas variedades de guisantes. Vidal-Valverde y col. (2002), Frías y col. (1995) y Savage (1988) observaron una actividad inhibidora de tripsina en lentejas de 5,12 TIU/mg s.s., 5 TIU/mg s.s. y 0,2-5,12 TIU/mg s.s., respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran descensos en la actividad inhibidora de tripsina en las harinas funcionales de leguminosas obtenidas después de la actuación enzimática. Esto puede ser debido a las condiciones utilizadas (37°C, solución tamponada pH 5,5) en la incubación de las harinas durante 60 min, 90 min, 120 min y 18 h. Son bastantes numerosas las referencias bibliográficas que indican las modificaciones en los valores de TIA como consecuencia de los procesos de remojo. Vidal-Valverde y col. (2002) observaron ligeros descensos en el TIA durante el remojo de lentejas a 28°C y 30°C durante 60 minutos, siendo más acusados al aumentar la temperatura. Márquez y Alonso (1999) publicaron que aunque durante el remojo de garbanzos en distintas soluciones (pH 2-7-11) durante 16 h a temperatura ambiente disminuía el TIA, ésta permanecía remanente al menos en un 70%. Wang y col. (2003) observaron ligeros descensos (4,5%-8,8%) en el TIA durante el remojo de 4 variedades de guisantes en agua durante 16 h a temperatura ambiente. Semejantes resultados han sido publicados por Alonso y col. (1998) en guisantes, El-Adawy y col. (2000) en soja y judías y Frías y col. (2000) en garbanzos.

Con respecto al contenido en nutrientes, los niveles de almidón total y disponible en los guisantes crudos fueron del 42,65% y 38,70%, respectivamente, y en lentejas del 39,91% y 35,65%, respectivamente. Kozłowska y col. (2001)

publicaron valores de almidón en guisantes entre 24,7%-57,4% y de 40,1%-57,4% en lentejas.

Sotomayor y col. (1999) observaron que se producía un incremento de los niveles de almidón cuando las harinas de lentejas se remojaran durante 24 h tanto a 28°C como a 42°C. Resultados similares se obtuvieron en nuestro trabajo. Estos autores concluyeron que el gradual incremento en almidón (en %) observado en las harinas durante las primeras 24 h, pudiera estar relacionado con el descenso de carbohidratos solubles (como ocurre en nuestro caso). Frías (1992) observó un aumento del contenido de almidón en lentejas cuando se sometieron a procesos de remojo en agua destilada y solución de ácido cítrico. Barampana y Simard (1995) encontraron que el contenido de almidón se incrementaba un 7,3% con el remojo de judías a 22°C durante 12 horas. Sin embargo, otros autores han observado que el contenido de almidón se ve reducido como consecuencia del proceso de remojo a diferentes tiempos y temperaturas de leguminosas. Así, Jood y col. (1986) encontraron que se producía un descenso más acentuado del contenido en almidón en diferentes leguminosas en el caso del remojo en medio básico en comparación con el realizado en agua. El-Adawy y col. (2000) pusieron de manifiesto que el remojo de soja, judías y altramuza en bicarbonato sódico al 0,5% durante 9 h producía un ligero descenso del contenido en almidón (7%, 2,4%, 26%, respectivamente). Vidal-Valverde y col. (1998) y Frías y col. (2000) observaron que el almidón total de habas y garbanzos, respectivamente, disminuía durante el remojo y que esta disminución era independiente del medio acuoso utilizado.

Los niveles de tiamina y riboflavina en los guisantes crudos fueron de 0,73 mg/100g s.s. y 0,15 mg/100g s.s., respectivamente, y en lentejas de 0,32 mg/100g s.s. y 0,33 mg/100g s.s., respectivamente. Estos datos son

similares a los encontrados en la bibliografía por Vidal-Valverde y col. (2003) con valores que oscilaban entre 0,59-1,03 mg/100g s.s. de tiamina y 0,11-0,37 mg/100g s.s. de riboflavina, y Sierra y Vidal-Valverde (1999) de 0,76 mg/100g s.s. y 0,21 mg/100g s.s. en tiamina y riboflavina, respectivamente, en semillas de guisantes. Prodanov y col. (2004) observaron un contenido de tiamina de 0,43 mg/100g s.s. y riboflavina de 0,06 mg/100g s.s., así como Savage (1988) de 0,24-0,72 mg/100g s.s. en tiamina y 0,2-0,49 mg/100g s.s. en riboflavina en semillas de lentejas.

Distintos autores han publicado diferentes resultados sobre el contenido de tiamina y riboflavina durante la incubación de harinas de leguminosas, dependiendo de las condiciones del proceso, si bien, a diferencia de nuestro trabajo, estos autores no descartan el líquido de remojo. Vidal-Valverde y col. (2002) observaron que el contenido en tiamina descendía durante la incubación de harinas de lentejas a 28°C y 42°C durante 60 minutos. De igual modo se produjo un descenso de riboflavina a 28°C, si bien su contenido se incrementó notablemente a 42°C. Prodanov y col. (2004) pusieron de manifiesto que el remojo de habas, garbanzos y lentejas durante 9 h en diferentes soluciones (agua pH 7, solución de ácido cítrico pH 4,96, solución de bicarbonato sódico pH 7,85) ocasionaba descensos en el contenido en tiamina y riboflavina de habas y garbanzos, sin embargo en el caso de las lentejas el contenido de tiamina decreció y el de la riboflavina se incrementó notablemente. Estos autores concluyen que, en general, se producen mayores pérdidas de ambas vitaminas cuando el remojo se lleva a cabo en soluciones alcalinas. Barampana y Simard (1995) encontraron que el contenido en tiamina en judías no se modificó mientras que el de riboflavina disminuyó con el remojo de judías a 22°C durante 12 horas.

A pesar de que nuestros resultados ponen de manifiesto que existen escasas diferencias entre las harinas funcionales obtenidas con o sin adición de enzima con respecto al contenido en los nutrientes y en los factores antinutritivos que hemos estudiado, otros miembros del equipo investigador que formaban parte del proyecto "Transformación y mejora del valor nutritivo de leguminosas mediante adición de enzimas" CICYT (ALI 97- 0636), pusieron de manifiesto que existían diferencias entre dichas harinas.

Antezana (2002) evaluó el contenido en fibra alimentaria en los guisantes var. Esla y lentejas var. Ángela utilizados en nuestro trabajo. Este autor, obtuvo valores de 23,3 g/100g s.s. y 20,2 g/100g s.s. de fibra total con un 96,5%-98,53% de fibra insoluble y 3,5%-1,5 de fibra soluble en guisantes y lentejas, respectivamente. Antezana y col. (2003) observaron que el contenido en fibra total e insoluble en las harinas funcionales de guisantes GE18 no cambió mientras que en GV18 disminuyó un 12% y 3% respectivamente. Por otra parte, los niveles de fibra soluble se incrementaron un 40% en GEV18 y 91% en GV18.

Dueñas (2003) puso de manifiesto que en las harinas de guisantes sometidas a los distintos tratamientos enzimáticos (GE60, GG60, GE90, GG90, GE120, GT120, GE18 y GV18) se producía un descenso del contenido en compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y se detectó la presencia del ácido ferúlico *trans*. En las harinas funcionales de lentejas (LE60, LG60, LE90, LG90, y LT120) encontró un descenso del contenido en los compuestos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, así como la presencia de ácido y aldehído gálico y, además, en LT120 un incremento (47%) del contenido de ácido protocatequico. Dicho autor observó también en las harinas funcionales LF60 y LG90 un descenso en el contenido en flavonoles y flavonas y en LT120 un incremento del 77%. En todas las harinas funcionales de lentejas, puso de

manifiesto un incremento del contenido en quercetina 3-O-rutinosido y luteolina, así como la presencia de resveratrol trans, excepto este último en LG90. El contenido en procianidinas y prodelphinidinas disminuyó en todas las harinas funcionales de lentejas. El contenido en catequina-3-O-glucosa fue más elevado en las harinas funcionales LF60, LG90, LT120 que las obtenidas mediante actuación de enzimas endógenas (LE60, LE90 y LE120).

Urbano y col. (2003) llevaron a cabo una evaluación nutricional de la proteína de las harinas funcionales de guisantes obtenidas mediante la adición de fitasa (GF60) y mediante la actuación de enzimas endógenas durante 60 minutos (GE60). Dichos autores observaron que la digestibilidad proteica (83%), y el balance de nitrógeno (159 mg/rata/día) del guisante crudo se mejoraba en dichas harinas funcionales, siendo la digestibilidad proteica y el balance de nitrógeno de GF60 y GE60 87%, 86% y 161 mg/rata/día, 191 mg/rata/día, respectivamente. Sin embargo, el coeficiente de eficacia de crecimiento de guisantes crudos (0,66), sólo se mejoró en las harinas funcionales GE60 (1,10). Por lo tanto, la calidad proteica de la harina funcional GE60 es superior a la obtenida con adición de fitasa (GF60) y a la de guisantes crudos.

Urbano y col. (2004) en el estudio llevado a cabo sobre la calidad proteica de las harinas funcionales de guisantes GE90, GG90, GE120, GT120, GE18 y GV18 observaron que la digestibilidad proteica solo se mejoró en las harinas funcionales GG90, que alcanzó cifras del 90%. El coeficiente de eficacia de crecimiento de guisantes crudos (0,66) se mejoró en todas las harinas funcionales de guisantes obtenidas (~1,11). El balance de nitrógeno de los guisantes crudos (150 mg/rata/día) se mejoró como consecuencia de los tratamientos enzimáticos, llegando a alcanzar cifras de 195 mg/rata/día en GG90 y GV18.

3.5. Conclusiones sobre harinas funcionales de guisantes y lentejas obtenidas mediante la acción de enzimas

1. Las condiciones óptimas del proceso de actuación de α -galactosidasas para obtener harinas funcionales de guisantes y lentejas son: solución tamponada ácido acético/NaOH pH 5,5 a 37°C durante 90 minutos.
2. La actuación enzimática produce en las harinas funcionales de guisantes y lentejas un menor contenido en los factores antinutritivos α -galactósidos, inositol hexafosfato, inositol pentafosfato y actividad inhibidora de tripsina.
3. En las harinas funcionales de guisantes y lentejas se observa la aparición de monosacáridos (fructosa, glucosa y galactosa), un mayor contenido en almidón total y disponible y un menor contenido en vitaminas B₁ y B₂.
4. Desde el punto de vista de los factores antinutritivos y nutrientes estudiados existen escasas diferencias en el contenido entre las harinas funcionales obtenidas mediante adición de enzimas y mediante la actuación de enzimas endógenas.

IV. HARINAS FUNCIONALES DE JUDÍAS OBTENIDAS MEDIANTE FERMENTACIÓN

IV. HARINAS FUNCIONALES DE JUDÍAS OBTENIDAS MEDIANTE FERMENTACIÓN

4.1. Materiales

4.1.1. Leguminosas

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron semillas de judías *Vigna sinensis* variedad Carilla.



Las semillas se limpiaron cuidadosamente, retirándose cualquier material extraño y se trituraron en un molino de bolas. Por último se pasaron por un tamiz de 0,5 mm de luz de malla, con el fin de obtener una harina homogénea.

4.1.2. Harinas funcionales de judías

Preparación de harinas funcionales de judías. Para el proceso de fermentación se prepararon las semillas sometiéndolas a un tratamiento de lavado con agua destilada (100g semillas/300 mL agua) y posterior secado en una estufa a 55°C durante 24 horas. Por último, se trituraron en un molino de bolas y se pasaron por un tamiz de 0,5 mm de luz de malla, con el fin de obtener una harina homogénea.

4.1.2.1. Optimización del proceso de fermentación

Se realizaron distintos ensayos de fermentación a pequeña escala con objeto de optimizar el proceso, teniendo en cuenta como actuaban sobre la flora microbiana y contenido en factores antinutritivos las siguientes variables: tipo de microorganismo, tiempo de fermentación y concentración de harina.

Optimización del tipo de microorganismo. Se realizaron dos tipos de fermentaciones controladas en matraces erlemneyer de 250 mL a 37°C durante 96 h y 150 rpm, con una concentración de harina de 220 g/L (peso harina/agua destilada, p/v). Las bacterias ácido-lácticas empleadas como inóculo fueron *Lactobacillus plantarum* CECT 748 (ATCC 14917) y *Lactobacillus fermentum* CECT 5153, de la colección de cultivos tipo del Instituto de fermentaciones Industriales (CSIC), en una proporción al 10% (v/v). El proceso se llevó a cabo por duplicado.

Optimización de la concentración de harina. Se realizaron distintas fermentaciones en matraces erlemneyer de 250 mL a 37°C y 150 rpm, con una concentración de harina de 220 g/L y 300 g/L durante 96 h. Las fermentaciones se realizaron con *L. plantarum* al 10% como inóculo. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

Optimización del tiempo de fermentación. Se realizaron distintas fermentaciones en matraces erlemneyer de 250 mL a 37°C y 150 rpm, con una concentración de harina de 300 g/L durante 48 h y 96 h. Las fermentaciones se realizaron de forma natural (con los microorganismos propios de las semillas de judías) y con *L. plantarum* al 10% como inóculo. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

4.1.2.2. Obtención de harinas funcionales

Se obtuvieron harinas funcionales de judías en las condiciones óptimas establecidas en los procesos de fermentación natural y con inóculo. Las harinas fermentadas de judías se sometieron a tratamiento en autoclave.

Obtención de harinas funcionales mediante fermentación natural. Las harinas de judías se fermentaron de forma natural, es decir, con los microorganismos propios de las semillas. Para ello, las harinas se suspendieron en agua destilada esterilizada (300 g/L). La fermentación se llevó a cabo a 37°C en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 48 h. Posteriormente, las harinas fermentadas se congelaron, se liofilizaron, se envasaron a vacío y se mantuvieron a 4°C en ausencia de luz. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

Obtención de harinas funcionales de judías mediante fermentación natural y calentamiento en autoclave. Las harinas de judías fermentadas de forma natural se sometieron a calentamiento en autoclave durante 20 minutos con objeto de eliminar la flora microbiológica presente y determinados factores antinutritivos termolábiles. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

Obtención de harinas funcionales mediante fermentación con inóculo. Las harinas se suspendieron en agua destilada esterilizada (300 g/L) y se inoculó con *Lactobacillus plantarum* (10%, v/v). La fermentación se llevó a cabo a 37°C en un fermentador sin aeración de 5L (Infors ISF-100, Infors AG, Switzerland) a 450 rpm durante 48 h. Posteriormente las harinas fermentadas se congelaron, se liofilizaron, se envasaron a vacío y se mantuvieron a 4°C en ausencia de luz. El proceso se llevó a cabo cuatro veces.

Obtención de harinas funcionales de judías mediante fermentación con inóculo y calentamiento en autoclave. Las harinas de judías fermentadas con inóculo se

sometieron a un calentamiento en autoclave durante 20 minutos, con objeto de eliminar la flora microbiológica presente y determinados factores antinutritivos termolábiles. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

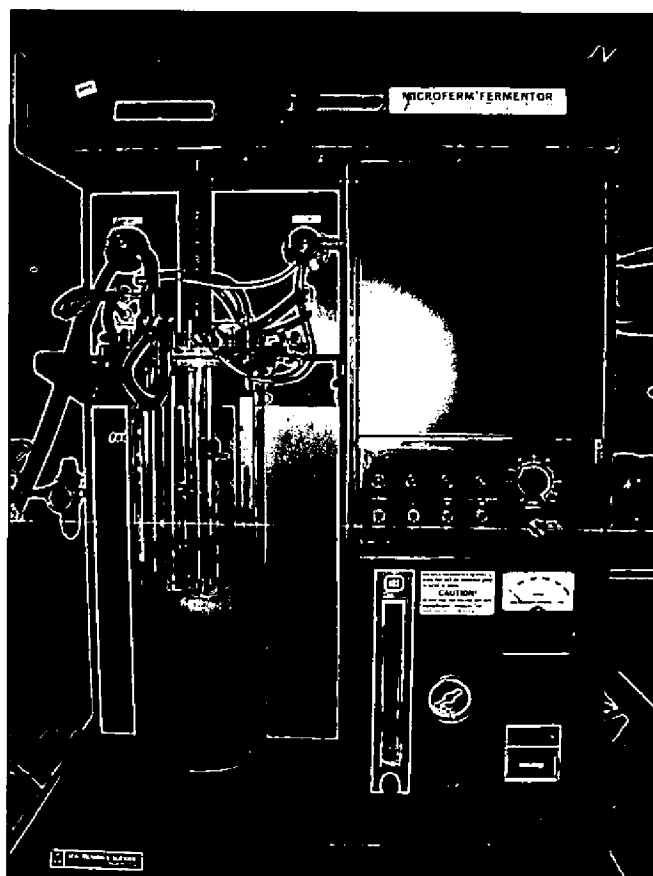


Foto 1. Fermentador Infors ISF-100, en el que se prepararon las harinas fermentadas.

4.2. Métodos de análisis

4.2.1. Determinación de humedad

El contenido en agua presente en las muestras se determinó de acuerdo con el apartado 3.2.1.

4.2.2. Determinación de carbohidratos asimilables

4.2.2.1. Análisis de monosacáridos y disacáridos

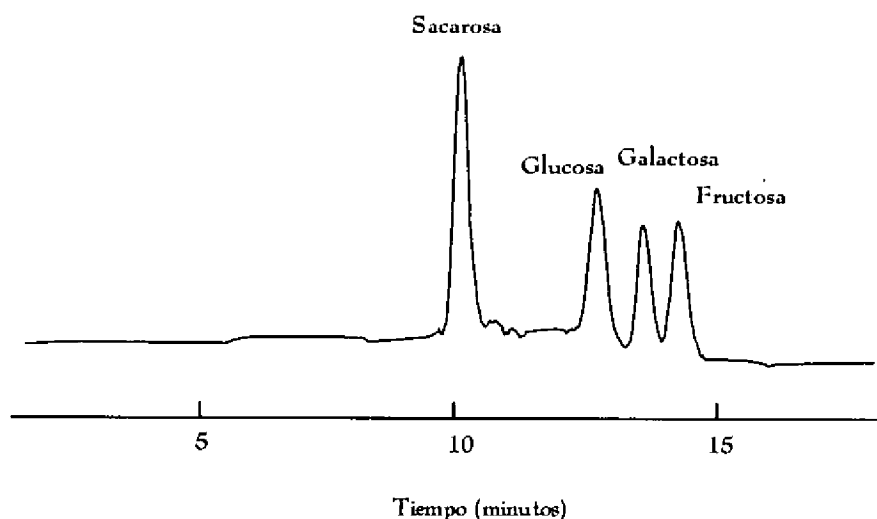
Los monosacáridos y disacáridos se extrajeron y purificaron de acuerdo a Granito y col. (2002) y se determinaron por cromatografía líquida de alta eficacia según Vidal-Valverde y col. (1985), como se detalla a continuación.

- Equipo.- Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de Índice de Refracción Waters 410.
- Columna de separación.- Sugar-Pak 1 (6,5 x 300 mm, Waters) acoplada a precolumna Sugar-Pak Guard-Pak (Waters).
- Fase Móvil.- Agua destilada Milli Q esterilizada, filtrada a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μm y desgasificada con helio. El flujo isocrático utilizado fue 0,4 mL/min.
- Sistema de termostatación (Modular Control, Waters) manteniendo la columna cromatográfica a 90°C.
- Volumen de inyección.- 20 μL

Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

En la Figura 10 se muestra el cromatograma de los monosacáridos y disacáridos patrón.

Figura 10: Cromatograma de los monosacáridos y disacáridos patrón



Los patrones utilizados fueron una mezcla de glucosa (Merck), fructosa (Merck), galactosa (Merck) y sacarosa (Merck), disueltas en la fase móvil correspondiente y filtrado a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μm .

La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón realizadas de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" fueron superiores a 0,990. El sistema cromatográfico estuvo controlado a través del programa de trabajo Máxima 820 mediante interfase Waters. Para determinar el contenido en monosacáridos y disacáridos presentes en las muestras, tanto crudas como procesadas, se empleó la siguiente ecuación:

$$\%Carbohidrato = (C_i / P \times 10^6 \times D \times V_{iny}) \times 100$$

Donde:

C_i : µg del carbohidrato correspondiente

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

D : Factor de dilución

V_{iny} : Volumen de muestra inyectado (mL)

4.2.2.2. Análisis almidón total y disponible

El análisis del contenido en almidón total y disponible se realizó de acuerdo con el apartado 3.2.2.2.

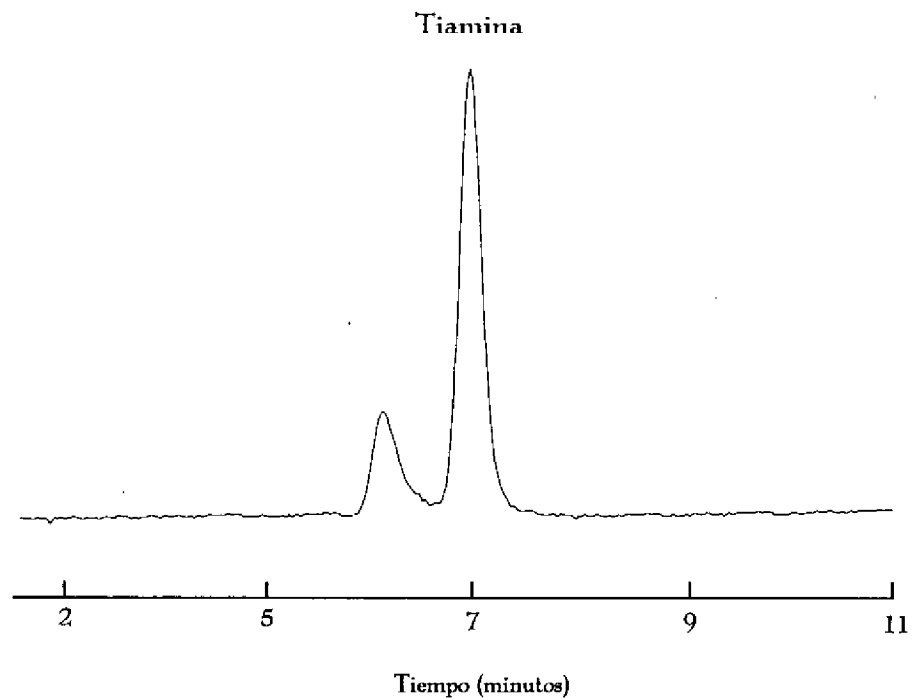
4.2.3. Determinación de vitaminas hidrosolubles

4.2.3.1. Análisis de vitamina B₁

El análisis del contenido en vitamina B₁ de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con el apartado 3.2.3.1.

En la Figura 11 se muestran el cromatograma obtenido para las judías crudas.

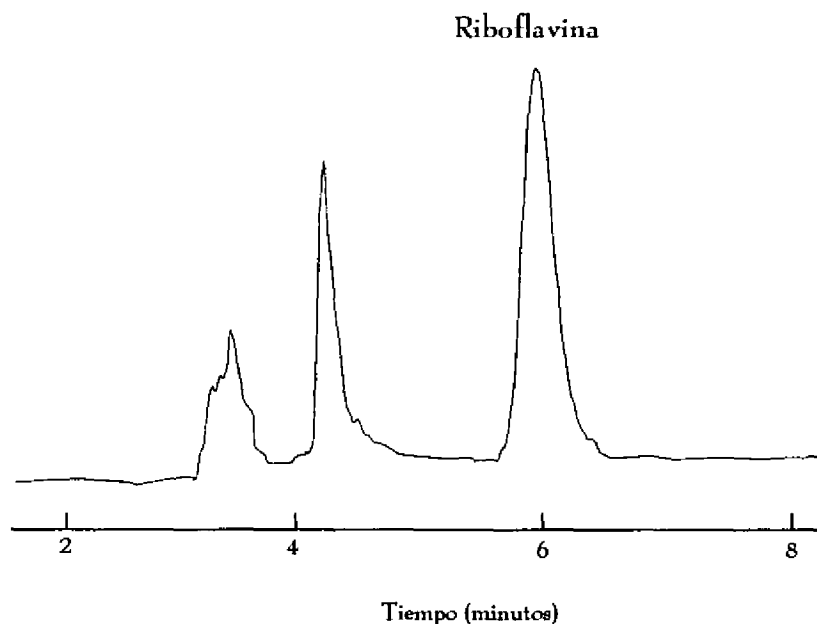
Figura 11: Cromatograma de tiamina en judías crudas



4.2.3.2. Análisis de vitamina B₂

El análisis del contenido en vitamina B₂ en las muestras se llevó a cabo de acuerdo con en el apartado 3.2.3.2.

En la Figura 12 se muestra el cromatograma obtenido para las judías crudas.

Figura 12: Cromatograma de riboflavina en judías crudas

4.2.3.3. Análisis de vitamina C

El contenido en vitamina C se determinó mediante el análisis del ácido ascórbico por electroforesis capilar de acuerdo al método descrito por Thompson y Trener (1995).

Extracción. A 1g de muestra se adicionaron 20 mL de ácido metafosfórico (Sigma) al 3% (p/v). La suspensión se introdujo en un homogeneizador Ultraturax (T25 basic IKA-WERKE, Germany) a 16.000 rpm durante 2 minutos en ausencia de luz y bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, se enrasó a 25 mL con ácido metafosfórico al 3% (p/v) y se filtró a través de papel Whatman n°1. Se tomaron 1,25 mL del filtrado y se adicionaron 100 µL de una solución de ácido isoascórbico (Fluka) en D,L-ditiotreitol (Sigma) al 0,2% (p/v) (600 µg/mL), se enrasó a 2 mL con D,L-ditiotreitol al 0,2% y se agitó vigorosamente. El D,L-ditiotreitol se añadió con objeto de prevenir la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Por último el extracto se filtró a

través de una membrana de nylon de 0,45 μm y se analizó por electroforesis capilar.

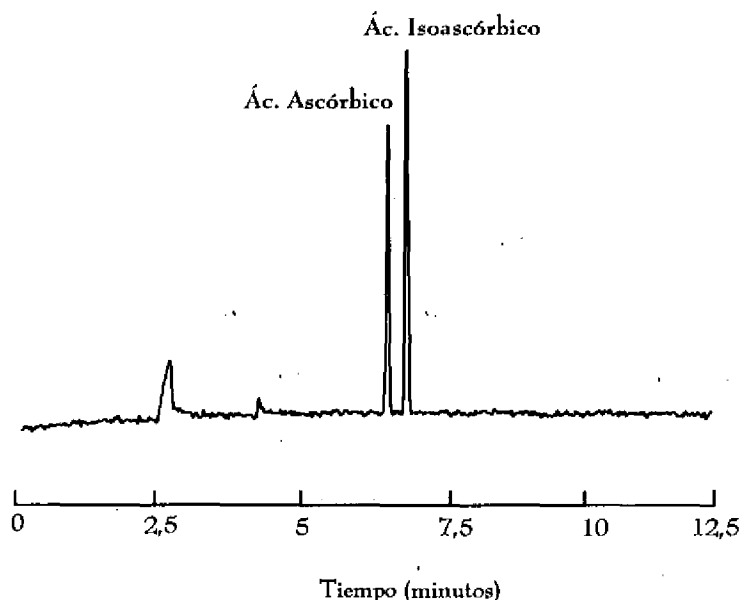
Condiciones electroforéticas utilizadas para el análisis de vitamina C: La determinación de vitamina C se realizó mediante electroforesis capilar en un equipo Beckman P/ACE System 2050 con detector de absorbancia variable a una longitud de onda de 254 nm a 0,01 AUFS (escala completa de unidades de absorción). Las condiciones electroforéticas utilizadas fueron:

- Capilar de sílice fundida TSPO75375 de 47cm de longitud total y 40 cm a la ventana del detector x 75 μm de diámetro interno (The Chase, Hallow, Woscester, UK).
- Voltaje aplicado 18KV.
- Sistema de termostatización a 28°C controlado por el programa de trabajo Beckman System Gold 7,10.
- Las inyecciones se realizaron a vacío durante 4 segundos.
- La separación electroforética se realizó en una solución tampón: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,01M/ H_2KPO_4 0,01M/deoxicolato sódico 0,05M (2,16g/100 mL) a pH 8,6.

Identificación y cuantificación. La identificación del ácido ascórbico en los extractos de judías crudas y fermentadas se llevó a cabo por técnicas de adición de patrón y su cuantificación se realizó relacionando las áreas de los picos electroforéticos con el área del patrón interno. Las curvas de calibración siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación “r” superiores a 0,990.

En la Figura 13 se muestra el electroforegrama de los patrones de vitamina C (ácido ascórbico e isoascórbico).

Figura 13: Electroforegrama de los patrones de ácido ascórbico e isoascórbico



Las soluciones patrón se prepararon disolviendo ácido L-ascórbico (AA, Merck) en una solución acuosa de D,L-ditiotreitol al 0,2%. Como patrón interno se usó el ácido isoascórbico (IAA, Fluka). 60 mg de AA y 30 mg de IAA se disolvieron en 10 mL de D,L-ditiotreitol al 0,2% y de este modo se obtuvieron 6mg/mL de concentración final de AA y 3mg/mL de IAA. A partir de esta solución madre se realizaron soluciones más diluidas en D,L-ditiotreitol al 0,2% hasta obtener concentraciones dentro del rango 64-1,02 $\mu\text{g/mL}$ de AA y 30-0,48 $\mu\text{g/mL}$ de IAA y con ellas se realizó la curva de calibrado. Se calculó el límite de detección del ácido L-ascórbico (AA) y ácido isoascórbico (IAA) que correspondieron a 12,70 pg (0,529 $\mu\text{g/mL}$) para el AA y 18,59 pg (0,775 $\mu\text{g/mL}$) para el IAA.

4.2.4. Determinación de vitaminas liposolubles

4.2.4.1. Análisis de carotenoides

El contenido en carotenoides de las judías crudas y procesadas se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia de acuerdo al método descrito por Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera (2001).

Extracción y purificación. Se extrajeron 2 g de muestra con 50 mL de acetona (Merck) hasta decoloración con un homogeneizador Ultraturrax (T25 basic IKA-WERKE, Germany) a 16.000 rpm durante 2 minutos en oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno. Los sobrenadantes se filtraron a vacío a través de papel Whatman n°1 y se depositaron en un embudo de decantación topacio. Se realizó una extracción etérea utilizando 150 mL de dietileter con BHT (butilhidroxitolueno, Fluka) al 0,1% y 200 mL de una solución acuosa de NaCl al 10% (p/v). Se repitió la extracción etérea con 150 mL de dietileter sobre la fase acuosa una vez más. Se mezclaron las fases etéreas y se adicionó 1 mL de una solución de patrón interno β -8'-apo-carotenal (5 μ g/mL en éter de petróleo, Sigma). A continuación se realizó una saponificación del extracto con 50 mL de KOH en metanol al 10% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente en continua agitación. El extracto saponificado se pasó de nuevo a un embudo de decantación topacio y se lavó con 200 mL de una solución acuosa de NaCl al 10% (p/v). Se descartó la fase acuosa y la etérea se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Se mezclaron las fases orgánicas y se filtraron a vacío a través de un lecho de sulfato sódico anhidro y se concentraron hasta sequedad en un rotavapor a vacío. El residuo se reconstituyó con 5 mL de acetona y se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 μ m. Por último, se congeló a -20°C bajo atmósfera de nitrógeno y en oscuridad hasta su posterior análisis.

Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta eficacia:

- Equipo.- Cromatógrafo compuesto por dos bombas Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de fotodiodos alineados Waters 996, utilizando 4 canales derivados: 295 nm, 445 nm, 450 nm y 470 nm.
- Columna de separación.- Spherisorb ODS2 5 μ m (25 cm x 4 mm d.i., Waters) con precolumna del mismo material (1 x 0,4 cm d.i.).
- Fase Móvil.- A \rightarrow Acetona

B \rightarrow Agua destilada Milli Q

Las fases móviles se filtraron a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 μ m y se desgasificaron con helio. Se utilizó un flujo con gradiente a 1,5 mL/min. controlado a través del programa de trabajo Millennium³² mediante interfase Waters en las siguientes condiciones:

Tiempo	Flujo	%A	%B
	1,5	75	25
5	1,5	75	25
10	1,5	95	5
20	1,5	95	5
21	1,5	100	0
24	1,5	100	0
30	1,5	75	25

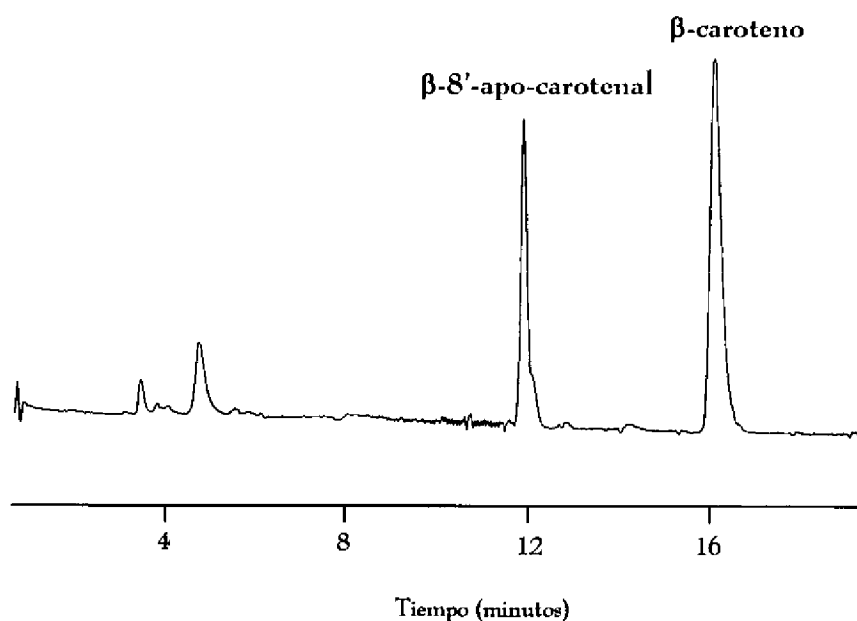
- Sistema de termostatación (Haake D8) de la columna de separación a 22°C.

- ♦ Volumen de inyección.- 20 μ L

Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

En la Figura 14 se muestra el cromatograma obtenido para los patrones del β -caroteno y patrón interno.

Figura 14: Cromatograma de β -8'-apo-carotenal y β -caroteno patrón



La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón realizadas de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación “r” fueron superiores a 0,990.

Para la realización de la curva patrón se prepararon distintas diluciones de β -caroteno (Sigma) a partir de una solución madre de 1 mg/mL (rango de concentración 2,12-0,212 μ g/mL) procesándolos de igual modo que la muestra y

distintas soluciones del patrón interno β -8'-apo-carotenal (Sigma) a partir de una solución madre de 1,2 mg/ mL (rango 115,52-0,430 μ g/mL). La pureza de ambos se calculó a partir de la absorbancia obtenida, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar ($E_{1\text{cm}}^{\%}$), para cada uno de ellos:

$$E_{1\text{cm}}^{\%} \text{ a } 453 \text{ nm (etanol) para } \beta\text{-caroteno} = 2620$$

$$E_{1\text{cm}}^{\%} \text{ a } 457 \text{ nm (éter de petróleo) para } \beta\text{-8'-apo-carotenal} = 2640$$

$$\text{Absorbancia } (\lambda) / E_{1\text{cm}}^{\%} \times (1/100) = \text{Concentración real (g/L)}$$

$$(C_{\text{REAL}} / C_{\text{TEÓRICA}}) \times 100 = \% \text{Riqueza}$$

Reemplazando los valores respectivos para cada solución patrón se obtuvo la pureza de los patrones de carotenos.

Por otro lado, se calculó el límite de detección del patrón β -caroteno, quedando establecido en las condiciones cromatográficas utilizadas en 0,184 μ g/mL.

4.2.4.2. Análisis de vitamina E

El contenido en vitamina E se determinó mediante el análisis de los distintos tocoferoles presentes en la muestra, mediante cromatografía líquida de alta eficacia, de acuerdo con el método descrito por Sierra y col. (1996), modificado por Frías y col. (2004).

Extracción y purificación. Se pesaron 2 g de muestra en un matraz de 250 mL y se añadieron 10 mL de una solución acuosa al 50% de KOH (p/v) y 50 mL de una solución metanólica de ácido ascórbico (Sigma) al 0,5% (p/v). Esta suspensión se mantuvo a reflujo en baño con agua a 80-90°C durante 20 minutos en ausencia de luz y bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 5°C y a 8.000 rpm.

Se recogió el sobrenadante en un matraz topacio y el residuo se lavó 2 veces con 100 mL de agua destilada y se centrifugó. Los líquidos sobrenadantes se extrajeron en un embudo de decantación topacio con 50 mL de dietileter que contenía BHT (butilhidroxitolueno, Fluka) al 0,1% con objeto de proteger los tocoferoles de la oxidación durante el proceso de extracción. Este proceso se repitió 2 veces. Los extractos etéreos se lavaron con agua destilada hasta que dio negativa su valoración con fenoftaleína, y así poder asegurarnos de haber eliminado totalmente los restos de KOH de la muestra. Las fases etéreas se concentraron en rotavapor a vacío a una temperatura inferior a 40°C. El residuo se disolvió en 5 mL de n-hexano:diisopropileter (90:10, v/v, Scharlau grado HPLC) y se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 µm. El extracto se conservó a -20°C, en ausencia de luz y bajo atmósfera de nitrógeno hasta su posterior análisis por cromatografía líquida de alta eficacia.

Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de tocoferoles por cromatografía líquida de alta eficacia:

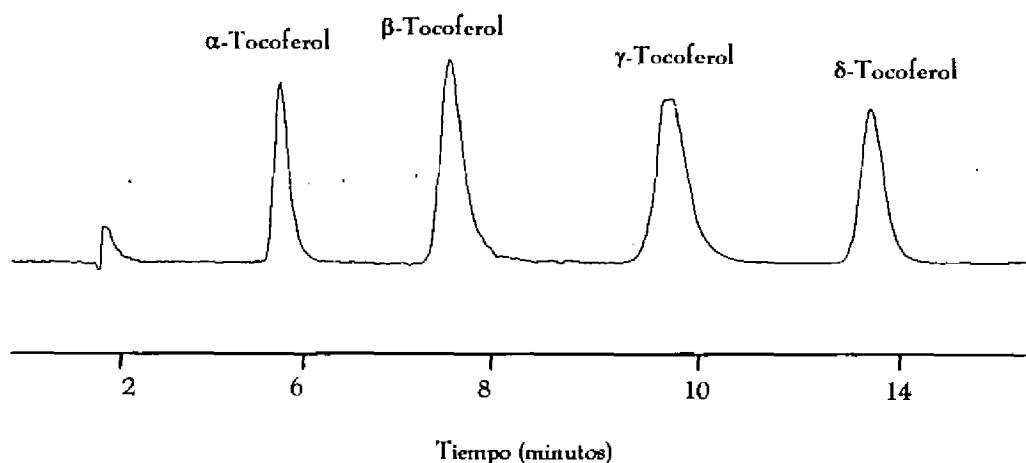
- ♦ Equipo.- Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de fluorescencia Waters 470, siendo la λ_{exc} 296 nm y la λ_{em} 320 nm.
- ♦ Columna de separación.- Lichrosorb Si 60 5µm (25 cm x 4,6 mm d.i., Technokroma) con precolumna Phenil/Corasil B (20 x 3,9 mm d.i.) termostatzada en baño Haake D8 a 30°C.
- ♦ Fase Móvil.- n-Hexano:Diisopropiléter (90:10, v/v). La fase móvil se filtró a través de una membrana de nylon Millipore FH de 0,45 µm y se desgasificó con helio. Se utilizó un flujo isocrático de 1,5 mL/min.
- ♦ Volumen de inyección.- 50 µL

Identificación y cuantificación. La identificación de los picos cromatográficos se realizó por comparación con los tiempos de retención de patrones procesados e inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y por técnicas de adición de patrón.

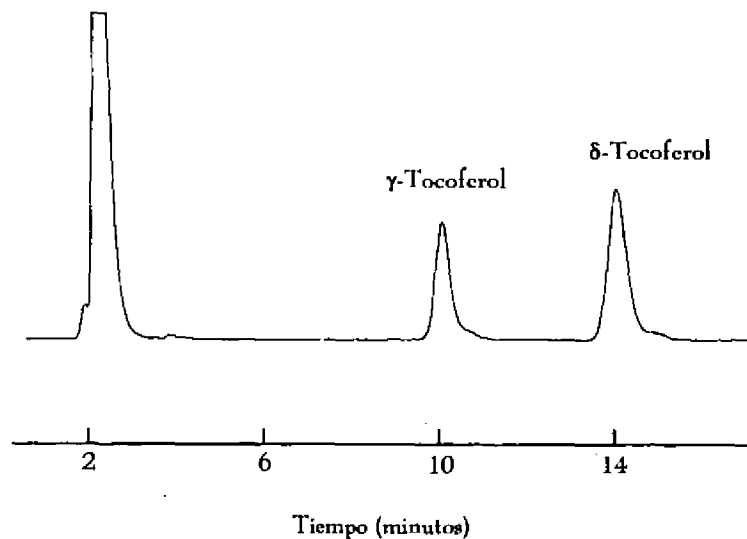
En la Figura 15a se muestra el cromatograma obtenido para los patrones de tocoferoles y en la Figura 15b el cromatograma para una muestra de judías.

Figura 15: Cromatograma de tocoferoles patrones y judías crudas

a) Patrones de tocoferoles



b) Tocoferoles de judías crudas



La cuantificación de las muestras se realizó dentro de los rangos lineales de curvas patrón realizadas de acuerdo con las áreas de los picos cromatográficos de los correspondientes patrones. Dichas curvas siempre fueron de primer orden y los coeficientes de correlación "r" fueron superiores a 0,990. El sistema cromatográfico se controló a través del programa de trabajo Máxima 820 mediante interfase Waters.

Para la realización de la curva patrón se prepararon soluciones madre de α -tocoferol (Sigma), β -tocoferol (Sigma), γ -tocoferol (Sigma) y δ -tocoferol (Sigma) con una concentración de 5 mg/mL en etanol absoluto. A partir de cada solución madre se preparó una solución con una concentración teórica de 0,1 mg/mL para el cálculo de la pureza, midiéndose la absorbancia a 294 nm (α -tocoferol), 297 nm (β -tocoferol) y 298 nm (γ -tocoferol y δ -tocoferol). La pureza de estas soluciones se calculó a partir de la absorbancia obtenida, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar ($E^{1\%cm}$) para cada vitámero en etanol (75,69 para el α -tocoferol a 294 nm; 86,4 para el β -tocoferol a 297 nm; 92,8 para el γ -tocoferol a 298 nm y 91,2 para el δ -tocoferol a 298 nm).

$$\% \text{ pureza} = (\epsilon_{\text{práctico}} / \epsilon_{\text{teórico}})$$

Según la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

A= Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar

b = espesor de la cubeta

c = concentración en moles/L

Reemplazando los valores respectivos para cada solución patrón se obtuvo las purezas de los patrones de tocoferoles.

A partir de las soluciones madres se prepararon distintas diluciones para uso diario. Para ello se tomó 1 mL de dichas soluciones madre y se llevó a un volumen final de 200 mL con n-hexano (Scharlau, grado HPLC). De estas soluciones más diluidas se tomaron diferentes volúmenes que se procesaron de manera similar a las muestras. Para la cuantificación de cada isómero de tocoferol se utilizó la siguiente fórmula:

$$mg \text{ tocoferol}/100g = (C_i / P \times 10^3 \times D \times V_{iny}) \times 100$$

Donde:

C_i : μg del tocoferol

P : Peso de la muestra (g en sustancia seca)

D : Factor de dilución

V_{iny} : Volumen de muestra inyectado (mL)

Por último, para la determinación de la actividad vitamínica E (expresada en $\alpha TEs/100g$ s.s.) se aplicó la siguiente fórmula (Eitenmiller y Landen, 1999):

$$Actividad \text{ vitamínica } \alpha TE/100g = (mg \alpha\text{-tocoferol} \times 1,0) + (mg \beta\text{-tocoferol} \times 0,5) + (mg \gamma\text{-tocoferol} \times 0,1) + (mg \delta\text{-tocoferol} \times 0,03)$$

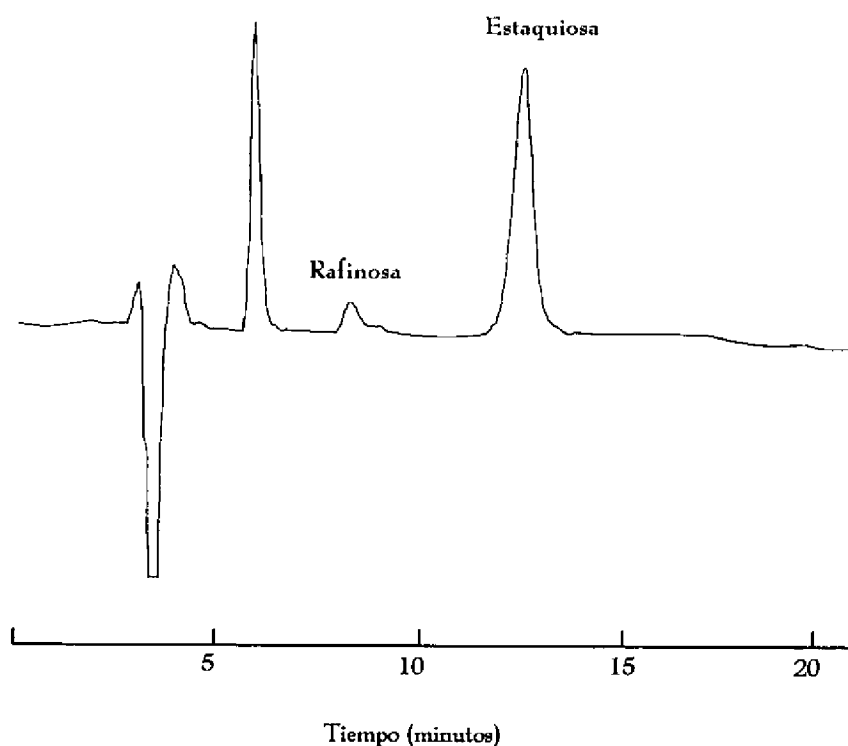
4.2.5. Determinación de factores antinutritivos

4.2.5.1. Análisis de α -galactósidos

Los α -galactósidos de las muestras se extrajeron, purificaron y determinaron por cromatografía líquida de alta eficacia de acuerdo con Granito y col. (2002) como se indicó en el apartado 3.2.4.1.

En la Figura 16 se muestra el cromatograma de los α -galactósidos de judías crudas.

Figura 16: Cromatograma de los α -galactósidos de judías crudas



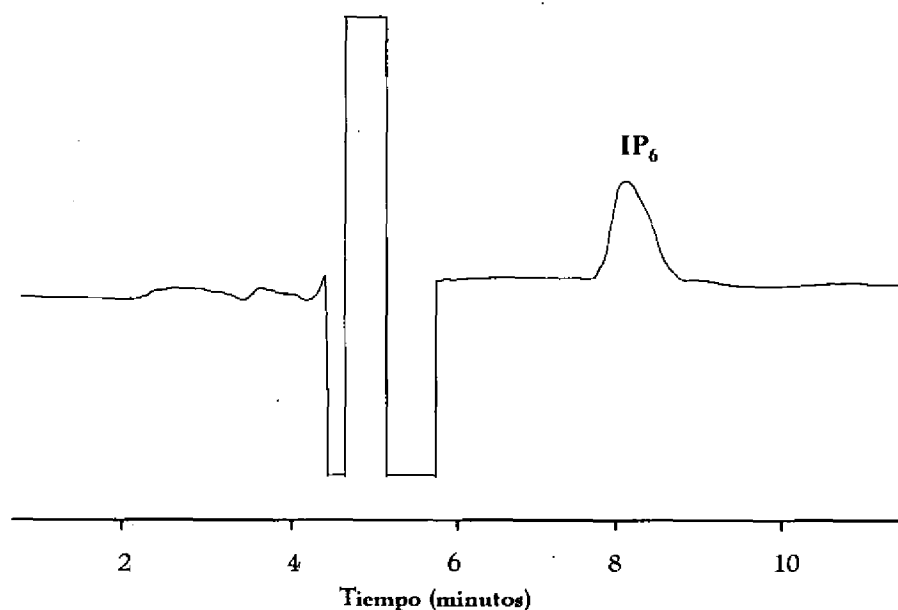
4.2.5.2. Análisis de inositol fosfatos

4.2.5.2.1. Determinación de inositol fosfatos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El análisis de inositol fosfatos se llevó a cabo de acuerdo con el apartado 3.2.4.2. tanto en las judías crudas y procesadas como en las fracciones obtenidas de inositol fosfatos patrón y de las harinas funcionales FN.

En la Figura 17 se muestra el cromatograma obtenido para esta leguminosa:

Figura 17: Cromatograma de los inositol fosfatos de la judías crudas



4.2.5.2.2. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN de 1H

Hidrólisis y extracción de fracciones de inositol fosfatos patrón. Se pesaron 1,5 g de un patrón de fitato sódico y se hidrolizaron con 100 mL HCl 0,5M durante 24 h a ebullición. La solución del hidrolizado obtenida, se purificó a través de una resina Dowex 50-X8 H^+ (Sigma, 200-400 mesh, a pH neutro) y se obtuvieron

diferentes fracciones de inositol fosfatos eluyéndolos con las siguientes concentraciones de HCl diluido: 0,52M; 0,50M; 0,38M; 0,32M; 0,28M; 0,15M; 0,08M. Las fracciones recogidas se evaporaron a sequedad y se redisolviéron en agua destilada.

Extracción y obtención de fracciones de inositol fosfatos de las harinas FN. Se extrajeron 10 g de harinas FN con 100 mL de HCl 0,5M en baño con agitación continua a 20°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm a 5°C durante 30 minutos. El sobrenadante se congeló a -20°C durante toda la noche y se volvió a centrifugar en las condiciones indicadas anteriormente. Se concentró el sobrenadante en rotavapor a vacío (a temperatura inferior a 35°C) hasta sequedad. El residuo se disolvió en 100 ml de agua destilada con ayuda del ultrasonido y se pasó por una resina Dowex 50-X8 H⁺ (Sigma), 200-400 mesh a pH neutro. Se lavó la resina con 100 mL de agua destilada y se descartó el eluido. A continuación, se pasaron 100 mL de HCl 2N y el eluido se recogió en un matraz y se evaporó a sequedad. El residuo se redisolvió en 100 mL de agua destilada y la solución se pasó de nuevo por la resina Dowex 50-X8 H⁺ a pH neutro, descartando el eluido. Con la muestra cargada en la columna se eluyeron y recogieron diferentes fracciones empleando distintas concentraciones de HCl diluido (0,52M-0,08M), de igual forma que para los patrones. Las fracciones recogidas se evaporaron a sequedad y se redisolviéron en agua destilada.

Determinación de inositol fosfatos. Las fracciones recogidas de los inositol fosfatos de patrón y de la harina FN se analizaron por espectroscopía de RMN de ¹H. Las fracciones de inositol fosfatos analizadas por RMN fueron previamente evaporadas a sequedad y redisueltas en agua deuterada.

Las condiciones experimentales utilizadas para la obtención de espectros de RMN ¹H fueron las siguientes:

Los espectros de ^1H se registraron en aparato Varian a 400 MHz, en agua deuterada como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresaron como partes por millón (ppm, escala δ) y están referenciadas al protón residual del disolvente. La intensidad de la señal del disolvente se redujo mediante la técnica de pre-saturación de la señal.

Los espectros COSY 2D se registraron en la modalidad fase-sensitiva. Los datos se recogieron en una matriz 1024 x 256 con un ancho espectral de 5000 Hz y 2 s de desfase, y se procesaron en una matriz 1024 x 1024.

4.2.5.3. Análisis de la actividad inhibidora de tripsina

La determinación de la actividad inhibidora de tripsina en las judías crudas y procesadas se llevó a cabo de acuerdo con el apartado 3.2.4.3.

4.2.6. Capacidad antioxidante

4.2.6.1. Determinación de glutathion reducido-glutathion oxidado

La determinación de los niveles de glutathion de las muestras de judías crudas y procesadas se llevó a cabo realizando una extracción de acuerdo con el método desarrollado por Smith y col. (1988), y su posterior cuantificación por espectrofluorimetría, basado en la reacción del *o*-ftalaldehído (OPT) como reactivo fluorescente, según Hissin y Hilf (1976).

Los reactivos y soluciones utilizadas son los siguientes:

- ♦ Glutathion en forma reducida (GSH): 98-100% $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, $P_m = 307,3$ g/mol (Sigma).
- ♦ Glutathion en forma oxidada (GSSG): 98% $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}_2$, $P_m = 612,6$ g/mol (Sigma).

- ♦ Tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1M pH 8,0
- ♦ Tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1M pH 8,0 con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, Sigma) 0,005M
- ♦ Polivinilpirrolidona K90 (PVP, Sigma) al 1% en tampón fosfato con EDTA.
- ♦ O-ftalaldehído (OPT, Sigma): 1mg /mL en metanol
- ♦ N-Etilmaleimida (NEM, Sigma) 5mg /mL en agua doblemente destilada.
- ♦ NaOH 0,1M

Extracción. Se extrajeron 50 mg de muestra con 2 mL de una solución al 1% de PVP en tampón fosfato 0,1M (pH 8,0) con EDTA 0,005M durante 30 segundos en un homogeneizador Ultraturrax (T25 basic IKA-WERKE, Germany) a 16.000 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para la determinación del contenido de glutathion reducido-glutathion oxidado se tomó una alícuota del sobrenadante de dicho extracto.

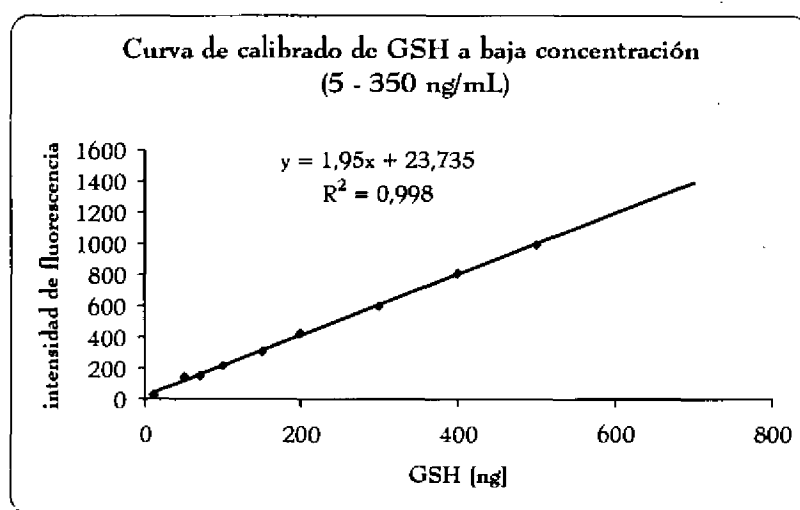
Determinación de glutathion reducido (GSH)- Se basa en la fluorescencia que se produce al reaccionar a pH 8,0 el o-ftalaldehído (OPT) con el glutathion reducido (GSH).

60 μL del extracto se mezclaron con 1,84 mL de tampón fosfato 0,1M que contenía 0,005M de EDTA (pH 8,0) y con 100 μL de solución de OPT. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurrido dicho tiempo se transfirió a una cubeta de cuarzo y el contenido de GSH se determinó por fluorescencia ($\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$). De forma paralela, se llevó a cabo la determinación en un blanco (tampón fosfato EDTA),

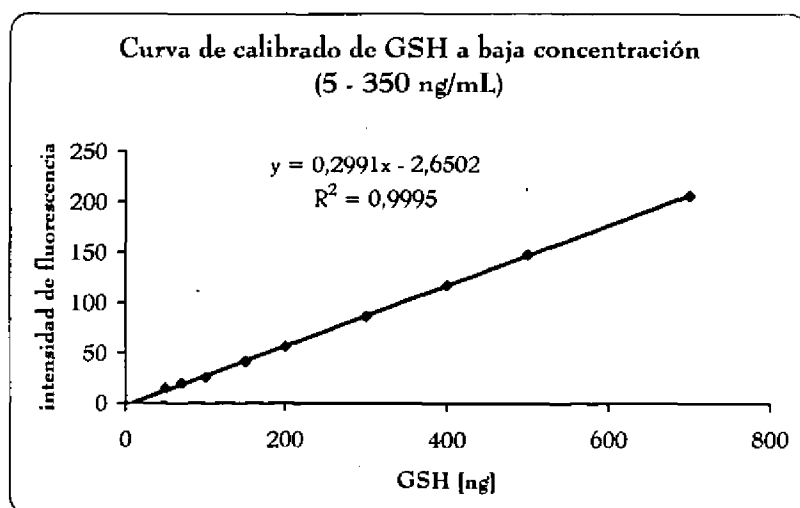
para descartar la posible contribución de los reactivos utilizados en la medida de fluorescencia.

Para la cuantificación de GSH se prepararon una serie de diluciones de GSH en tampón fosfato 0,1M (0,005M de EDTA pH 8,0) a partir de una solución madre 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El rango de concentraciones establecido fue 5ng - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se trabajó con dos anchuras de banda diferentes: 5,0 y 2,5. En las siguientes Figuras se representa la curva de calibrado de las concentraciones de GSH frente a la intensidad de fluorescencia a las anchuras de banda utilizadas.

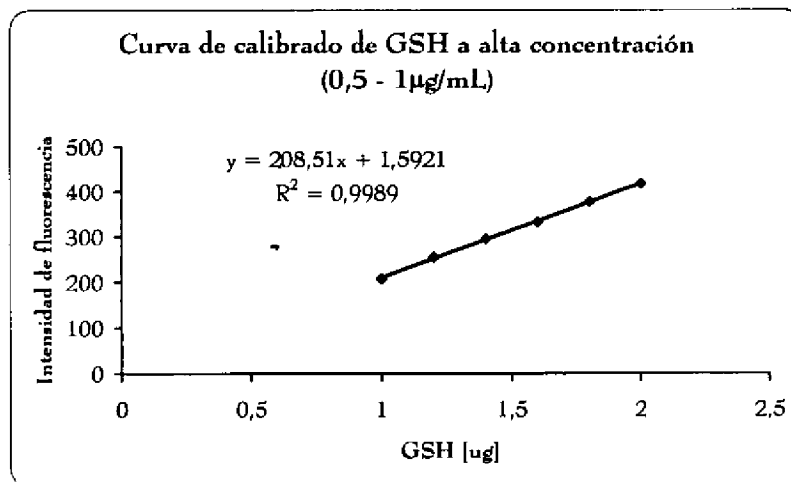
Anchura de banda $\lambda_{\text{exc}} 5,0/\lambda_{\text{em}} 5,0$



Anchura de banda $\lambda_{\text{exc}} 5,0/\lambda_{\text{em}} 2,5$



Anchura de banda $\lambda_{exc} 5,0 / \lambda_{em} 2,5$



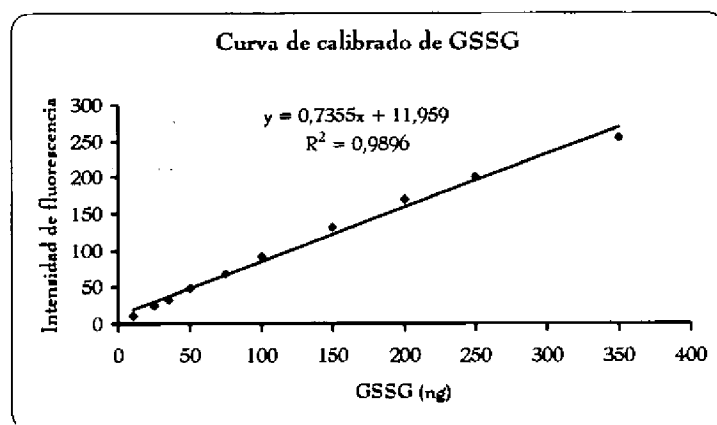
Determinación de glutation oxidado (GSSG).-Se basa en la fluorescencia que se produce al reaccionar a pH 12,0 el o-ftalaldehído (OPT) con el glutation oxidado (GSSG). El GSH se acomplejó con N-etilmaleimida (NEM) para prevenir la interferencia del GSH en la medida del GSSG.

200 μL del extracto se mezclaron con 200 μL de NEM 0,04M y se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos. A 100 μL de la mezcla de incubación se añadió 1,8 mL de NaOH 0,1M y 100 μL de la solución de OPT y se mantuvo de nuevo a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo se transfirió a una cubeta de cuarzo y el contenido de GSSG se determinó por fluorescencia ($\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$). De forma paralela se llevó a cabo la determinación de esta medida en un blanco para descartar la posible contribución de los reactivos utilizados en la medida de fluorescencia.

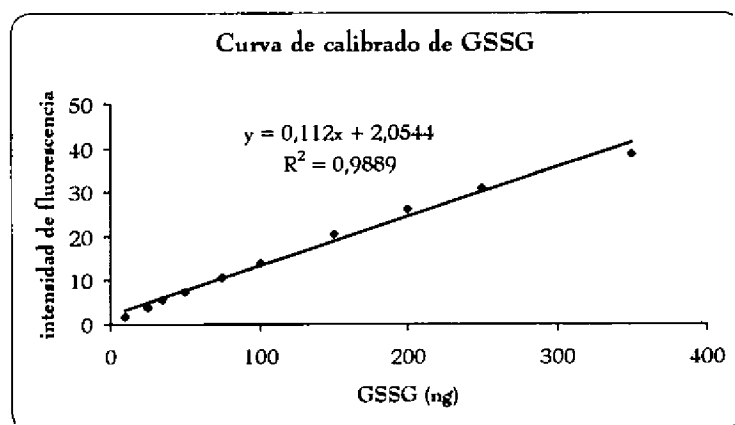
Para la cuantificación de GSSG se prepararon una serie de diluciones de GSSG en NaOH 0,1M (pH 12,0) a partir de una solución madre 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. El rango de concentraciones establecido fue 5ng - 250ng/mL y, como en el caso de la determinación de GSH, se trabajó en dos anchuras de banda, 5,0 y 2,5. En las

siguientes Figuras se representa la curva de calibrado de las concentraciones de GSSG frente a la intensidad de fluorescencia a las anchuras de banda utilizadas.

Anchura de banda λ_{exc} 5,0/ λ_{em} 5,0



Anchura de banda λ_{exc} 5,0/ λ_{em} 2,5



Los valores obtenidos se cuantificaron con respecto a las curvas patrón y se expresaron como μ moles GSH o GSSG / g harina en sustancia seca.

4.2.6.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa utilizando el KIT Ransod (Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK). Este método emplea el sistema Xantina-Xantina oxidasa para la generación de radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que reaccionan posteriormente con el compuesto cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-

nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) para formar un complejo coloreado. La capacidad de la enzima SOD de los extractos para secuestrar los radicales superóxido formados se midió por el grado de inhibición de esta reacción a 505 nm.

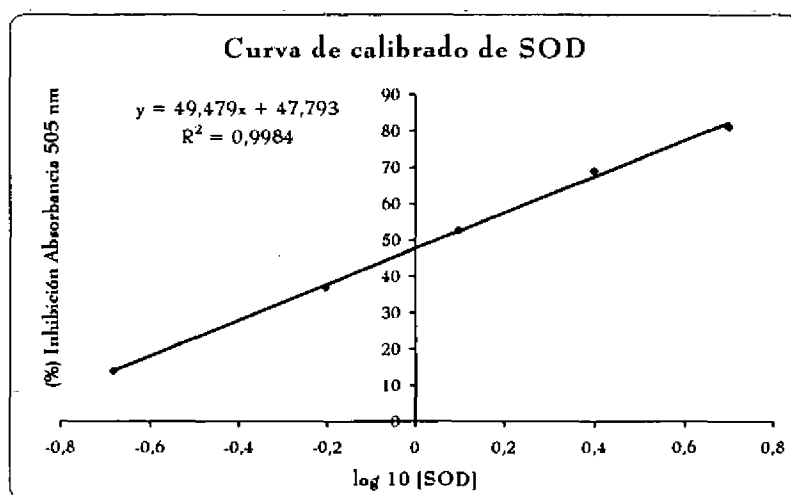
Los reactivos y soluciones utilizadas fueron los siguientes:

- ♦ Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 (Sigma).
- ♦ Sustrato mixto: Xantina (0,05 mmol/L), I.N.T. (cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium) (0,025 mmol/L) (KIT Ransod).
- ♦ Tampón: CAPS (40 mmol/L, pH 10,2) y EDTA (0,94 mmol/L) (KIT Ransod).
- ♦ Xantina oxidasa 80 U/L (KIT Ransod).
- ♦ Patrón SOD 5 U/mL (KIT Ransod).

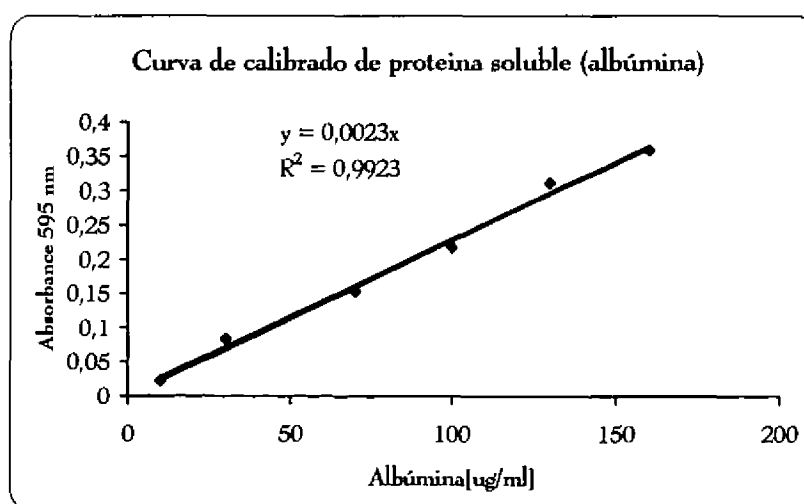
Extracción. La extracción se llevó a cabo de acuerdo con Zielinski y Kozłowska (2000). Se pesaron 0,5 g de harina y se suspendieron en 5 mL de la solución tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4, y se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. En los líquidos sobrenadantes se determinó la actividad SOD.

Determinación de la actividad SOD. 25 μ L de extracto se mezclaron en un tubo de ensayo con 850 μ L de sustrato mixto. Se agitó en el vortex y se incubó a 37°C durante 1 minuto. A continuación, se adicionaron 125 μ L de xantina oxidasa, se agitó en el vortex, se transvasó a una cubeta de cuarzo y después de 3 minutos se midió la absorbancia a 505 nm.

Para realizar la correspondiente curva de calibrado se utilizó el patrón de SOD del KIT Ransod. El porcentaje de inhibición de la reacción en función del logaritmo en base 10 de diferentes concentraciones del patrón nos permitió calcular las unidades de SOD /mL de los extractos de judías analizados. En la siguiente Figura se representa la curva de calibrado del \log_{10} de la concentración de SOD frente al porcentaje de inhibición.



Los resultados finales se recalcularon por mg de proteína soluble de acuerdo con el método Bradford (1976) para lo que se utilizó una solución patrón de proteína de albúmina de suero bovino (Sigma) y los resultados se expresaron como unidades de SOD/mg proteína. En la siguiente Figura se representa la curva de calibrado de proteína soluble como concentración de albúmina frente a la absorbancia a 595 nm.



4.2.6.3. Determinación de la capacidad para atrapar radicales peroxilo

La determinación de la capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC) se llevó a cabo de acuerdo con el método desarrollado por Bartosz y col. (1998). Dicho método utiliza la descomposición térmica del 2-2'-azobis(2-amidopropano) hidrócloro (ABAP) como fuente de radicales peroxilo y alcoxilo que, posteriormente, reaccionan con el 2-2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) originando un radical catión de color verde-azulado ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). La duración del tiempo de inhibición del color ("lag time") se toma como parámetro para la determinación de la capacidad antioxidante para atrapar radicales peroxilo y alcoxilo de diferentes extractos.

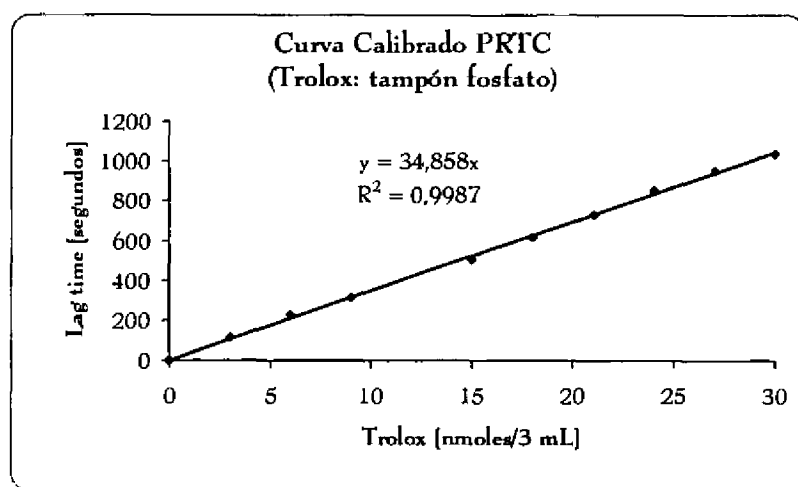
Los reactivos y soluciones utilizadas fueron los siguientes:

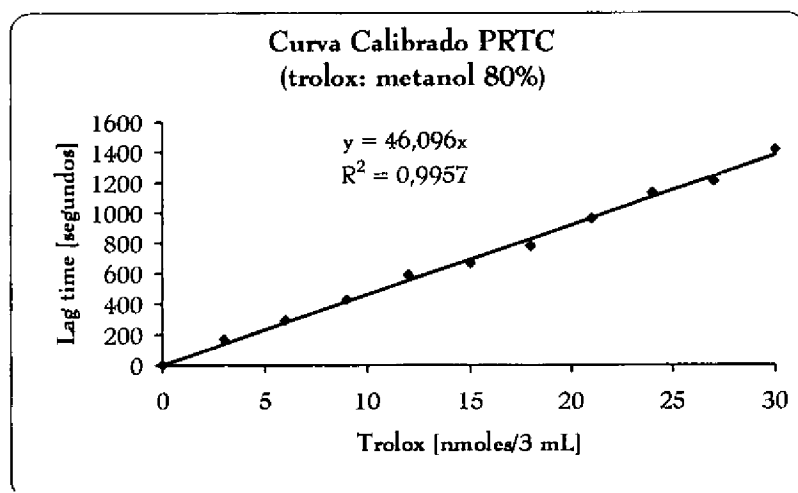
- ♦ Tampón fosfato (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) 0,1M pH 7,4
- ♦ ABTS: solución de ABTS (sal diamonio de 2-2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), Sigma-Aldrich) 5mM en tampón fosfato 0,1M.
- ♦ ABAP: solución de ABAP (2-2'-azobis(2-amidopropano) hidrócloro, Wako Pure Chemical Industries, Japan) 200mM en tampón fosfato 0,1M.

Extractos con PBS o con metanol. Se pesaron 0,5 g de harina y se suspendieron en 5 mL de la solución tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4 o metanol al 80%. La mezcla se mantuvo en agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente y ausencia de luz y se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. En el líquido sobrenadante se determinó el tiempo de inhibición en la formación de los radicales peroxilo y alcoxilo ("lag time").

Determinación de la capacidad para atrapar radicales peroxilo. En un tubo de ensayo se adicionaron 90 μL de la solución de ABTS, 2590 μL de tampón fosfato 0,1M y 20 μL del extracto con PBS o con metanol, se agitó en un vortex y se incubó en un baño con suave agitación a 37°C. A continuación se añadieron 300 μL de la solución de ABAP (volumen final 3 mL), se agitó la mezcla en un vortex, se trasnvasó a una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia a 414 nm para determinar los "lag time" de los diferentes extractos de judías crudas y procesadas.

El "lag time" es el tiempo en que la velocidad de reacción de los radicales peroxilo o alkoxilo formados con el antioxidante es mayor que la velocidad de reacción de esos radicales con el ABTS. La duración del tiempo de inhibición de dichos "lag time" se valora la capacidad que tienen los extractos para atrapar los radicales peroxilo y alkoxilo y así inhibir la formación del catión coloreado ABTS^{*+} . La cuantificación de los extractos se llevó a cabo utilizando una curva de calibrado de distintas concentraciones de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico) en tampón PBS o metanol al 80%. En las siguientes Figuras se representa la curva de calibrado de la concentración de trolox frente a los "lag times" obtenidos en tampón fosfato y metanol al 80%.





Los resultados finales de los distintos extractos se expresaron como μ moles Trolox / g harina en sustancia seca.

4.2.6.4. Determinación con liposomas de la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica

El método se basa en la medida de la inhibición de la peroxidación lipídica de las membranas unilaminares de liposomas formados a partir de fosfatidilcolina de yema de huevo de acuerdo con el método descrito por Terao y col. (1994).

Purificación de la fosfatidilcolina. Con el fin de purificar la fosfatidilcolina de yema de huevo sin oxidar (PC) de la fracción oxidada (PCOOH) se disolvió 1 g de fosfatidilcolina comercial (Sigma) en 10 mL de una mezcla de cloroformo/metanol/agua 1:10:0.5 (v/v/v) y se inyectaron volúmenes de 1 mL en un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia.

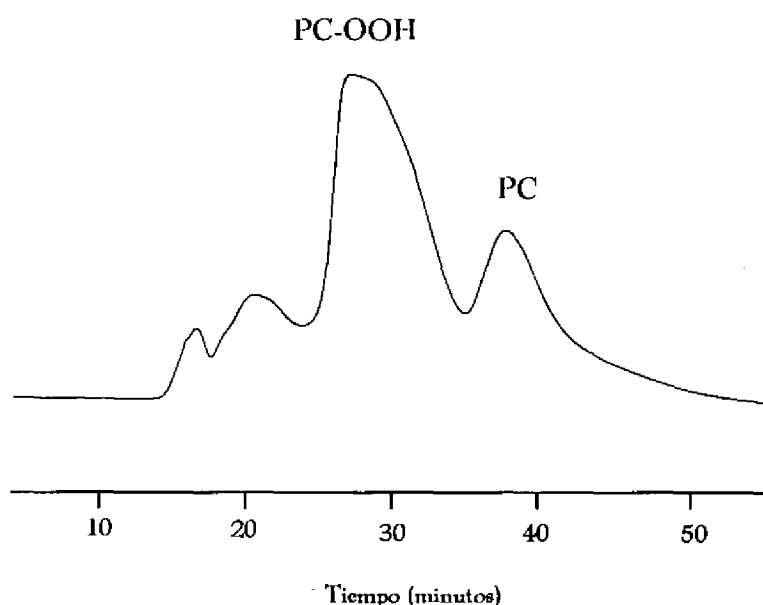
Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ Equipo: Cromatógrafo compuesto por una bomba Waters 510, inyector manual Rheodyne 7125 y detector de Diode-Array (fotodiodos alineados) Waters 996 a una longitud de onda establecida de 235nm, controlado por el programa Millenium³².

- Columna preparativa C₈ Lichroprep RP-8 (40-63 µm, Merck).
- Fase móvil: cloroformo/metanol/agua 1:10:0.5 (v/v/v) a un flujo de 1mL/min.

En el Figura 18 queda recogido el cromatograma obtenido para la purificación de la fosfatidilcolina de yema de huevo.

Figura 18: Cromatograma de purificación de la fosfatidilcolina



La fracción recogida entre los minutos 25 y 34 correspondió a la fosfatidilcolina oxidada (PCOOH). La fracción de fosfatidilcolina sin oxidar (PC) se recogió entre los minutos 36 y 41. Después de sucesivos análisis se juntaron por separado las fracciones recogidas de PCOOH y de PC. Dichas fracciones se concentraron y se liofilizaron en ausencia de luz y bajo atmósfera de nitrógeno. La fracción de PC se disolvió en cloroformo y la fracción de PCOOH en metanol, y se conservaron a -20°C en ausencia de luz y bajo atmósfera de nitrógeno hasta posteriores análisis.

Extracción. Se pesó 1 g de muestra y se añadieron 25 mL de PBS y se extrajo durante 2 minutos en un homogeneizador Ultraturrax (T25 basic IKA-WERKE, Germany) a 16.000 rpm bajo atmósfera de nitrógeno y en oscuridad. Por último, se filtró a través de papel Whatman n° 1 y por membrana de nylon de 0,45µm. El extracto se mantuvo a -20°C, bajo atmósfera de nitrógeno y en oscuridad mientras se procedía a la preparación de los liposomas.

Formación de liposomas. Para la obtención de los liposomas, en un tubo de ensayo se añadió una alícuota de 0,7 mL de la solución de PC en cloroformo y se evaporó a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno, girando continuamente el tubo con el fin de obtener una película lo más fina posible de PC en el fondo del mismo. A continuación, los restos de cloroformo que quedaban en el tubo se evaporaron en un liofilizador y su contenido se resuspendió en 1 mL de solución tampón tris pH 7,4. Esta suspensión se agitó 30 segundos en vortex y 30 segundos en ultrasonido por dos veces consecutivas. A continuación, se pasó 21 veces por el aparato LipoFast Basic (Avestin, S.L.) a través de una membrana de policarbono de 100µm de tamaño de poro, quedando finalmente una suspensión de liposomas prácticamente transparente.

Los reactivos y soluciones utilizadas fueron los siguientes:

- ♦ Solución de PC: fosfatidilcolina de yema de huevo libre de peróxidos (concentración 8,5 mg/mL en cloroformo, Sigma).
- ♦ Solución tampón tris pH 7,4:

TRIS 10mM (Hidroximetilamino-metano, Sigma)

DTPA 0.5mM (ácido dietilenotriaminopenta-acético, Sigma)
- ♦ AAPH 110 mM (2,2'-Azobis(2-aminopropano)dihidrocloruro, Aldrich)
en tampón tris

- ♦ Tampón fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,4. Se pesaron 14,18 g de Na_2HPO_4 (Merck) (solución A) y 6,9 g de NaH_2PO_4 (Merck) (solución B), y se disolvieron en 1 L y 500 mL de agua destilada, respectivamente. Se mezclaron 810 mL de la solución A con 190 mL de solución B y se añadieron 8,76 g de NaCl y se ajustó el pH a 7,4 con la solución B
- ♦ Metanol (Scharlau, grado HPLC)
- ♦ Cloroformo (Lab-Scan, grado HPLC)
- ♦ Agua doblemente destilada

Determinación de peróxidos de fosfatidilcolina. 0,5 mL de los liposomas formados se suspendieron en 0,5 mL de tampón tris pH 7,4 y se añadieron 50 μL de extracto (muestras) o de tampón PBS (control). Se agitó en el vortex para su homogenización y se preincubó en un baño-agitador a 37°C, en oscuridad, durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos se añadieron 100 μL del iniciador de radicales AAPH, se agitó en el vortex para su homogenización, y se incubó en oscuridad durante 4 h a 37°C, en continua agitación.

Se inyectaron alícuotas de 20 μL cada hora en un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta-visible y se determinó la cantidad de peróxidos de fosfatidilcolina (PC-OOH) formados cada 60 minutos durante 4 horas de incubación.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ Equipo: Cromatógrafo compuesto por una bomba Kontron 320, inyector manual Rheodyne 7125 controlado por el programa Beckman System Gold 7,10

- ♦ Detector ultravioleta-visible Waters 484, a una longitud de onda de 235 nm
- ♦ Columna analítica Nova Pak C8 (Waters)
- ♦ Fase móvil: metanol/agua (96:4) (v/v) a flujo isocrático de 0,5 mL/min

La cantidad de peróxidos formada se calculó a partir de la curva de calibración obtenida con PC-OOH y se expresó como mM de PC-OOH formados.

4.2.6.5. Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total de las muestras se llevó a cabo por dos métodos distintos, que sólo se diferenciaron en el compuesto que generó el radical ABTS^{•+}.

Método A: Se utiliza metamioglobina para la generación del radical ABTS^{•+}. Se determinó la capacidad relativa de los antioxidantes de las muestras para secuestrar el radical catión ABTS^{•+} mediante técnica espectrofotométrica comparando con la capacidad que tiene el patrón trolox (homólogo hidrosoluble del α -tocoferol). El método está basado en la formación de ferrilmetamioglobina a partir de metamioglobina en presencia de peróxido de hidrógeno, que es el responsable de la formación del radical catión ABTS^{•+} (Miller y col., 1993).

Extracto hidrofílico. Se pesaron 0,5 g de harina y se añadieron 5 mL de metanol al 80% en agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz y se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. En los líquidos sobrenadantes se determinó la capacidad antioxidante.

Los reactivos y soluciones empleadas fueron:

- ♦ Metanol al 80% (v/v).

- KIT Randox:

Tampón fosfato salino pH 7,4 (80 mmol/L)

Cromógeno: Metamioglobina (6,1 $\mu\text{mol/L}$), ABTS (610 $\mu\text{mol/L}$).

Sustrato: Peróxido de hidrógeno (Forma estabilizada) (250 $\mu\text{mol/L}$).

Patrón trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico, 1,7 mmol/L).

Valoración de la capacidad antioxidante. Se mezclaron en un tubo de ensayo 20 μL del extracto y 1 mL de cromógeno. A continuación, se agitó en vortex y se introdujo en un baño a 37°C durante 1 minuto. Seguidamente, se adicionaron 200 μL de sustrato, se agitó en el vortex y se trasvasó a una cubeta de cuarzo donde después de 3 minutos se midió la absorbancia a 600 nm.

Se utilizó el patrón trolox del KIT Randox para el cálculo del factor necesario en la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos, expresados como $\mu\text{moles trolox / g}$ harina.

$$\Delta A_{\text{MUESTRA}} = (A_{3\text{MIN}} - A_{0\text{MIN}})_{\text{MUESTRA}}$$

$$\Delta A_{\text{BLANCO}} = (A_{3\text{MIN}} - A_{0\text{MIN}})_{\text{BLANCO}} \quad \Delta A_{\text{PATRÓN}} = (A_{3\text{MIN}} - A_{0\text{MIN}})_{\text{PATRÓN}}$$

$$\text{FACTOR} = \frac{\text{CONCENTRACIÓN DE TROLOX (mmol/L)}}{\Delta A_{\text{BLANCO}} - \Delta A_{\text{PATRÓN}}}$$

$$\text{mmol Trolox/L muestra} = \text{FACTOR} \times (\Delta A_{\text{BLANCO}} - \Delta A_{\text{MUESTRA}})$$

Finalmente, la capacidad antioxidante total de la muestra, expresada como $\mu\text{moles Trolox/g s.s.}$, se calculó teniendo en cuenta la concentración de la muestra (0,5 g/5 mL).

Método B. Se utiliza persulfato potásico para la generación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Se determinó la capacidad relativa de los antioxidantes de las muestras para secuestrar el radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ mediante técnica espectrofotométrica comparando con la capacidad que tiene el patrón trolox. El método está basado en la generación previa del radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por la reacción del 2-2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS, Sigma) con persulfato potásico (Aldrich). La sustancia antioxidante reacciona con dicho catión verde-azulado provocando una inhibición del color. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante lecturas espectrofotométricas estimando los descensos de la absorbancia a 734 nm (Re y col. 1999).

Preparación del tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4: Se pesaron 14,18 g de Na_2HPO_4 (Merck) (solución A) y 6,9 g de NaH_2PO_4 (Merck) (solución B), y se disolvieron en 1 L y 500 mL de agua destilada, respectivamente. Se mezclaron 810 mL de la solución A con 190 mL de solución B y se añadieron 8,76 g de NaCl y se ajustó el pH a 7,4 con la solución B.

Preparación del radical. Para la formación del radical se preparó una solución acuosa 7mM de ABTS^{2-} y se hizo reaccionar con una solución de persulfato potásico 2,45mM en una proporción 2:1. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas antes de su uso, debido a que la absorbancia no es máxima y estable hasta transcurridas 6 horas. El radical es estable durante varios días si se almacena en oscuridad y a temperatura ambiente.

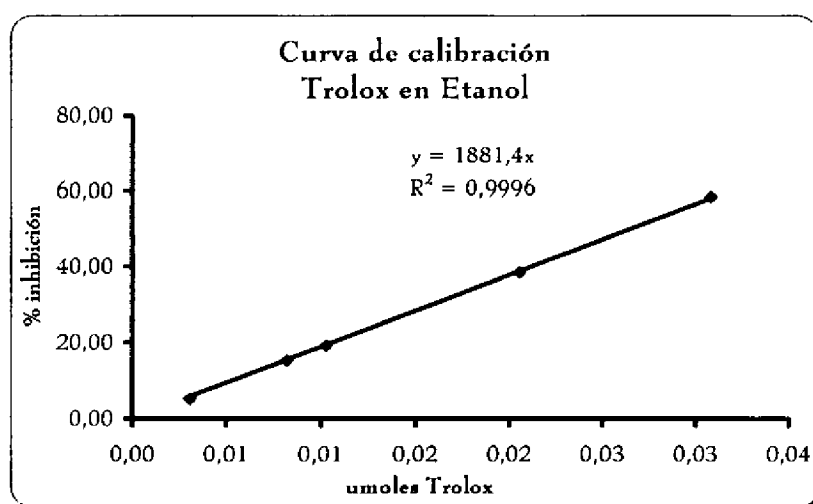
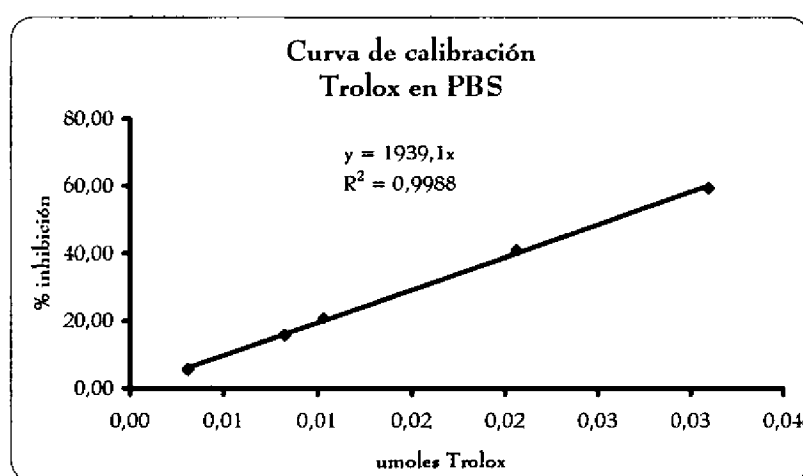
Extracto hidrofílico. Se llevó a cabo de acuerdo con Re y col. (1999). Se pesó 1 g de muestra, se añadieron 25 mL de tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4, se homogeneizó en Ultraturrax (T25 basic IKA-WERKE, Germany) durante 2 minutos a 16.000 rpm bajo atmósfera de nitrógeno y en oscuridad y se centrifugó a 20.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se filtró a

través de membrana de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro. A continuación, se realizaron distintas diluciones con concentraciones finales de 40, 25 y 15 mg/mL de muestra.

Extracto lipofílico. Se realizó de acuerdo con Pellegrini y col. (1999). Se pesaron 2 g de muestra, se añadieron 20 mL de una solución de diclorometano : agua destilada Milli Q (1:1, v/v), se homogeneizó con Ultraturrax durante 2 minutos a 16.000 rpm bajo atmósfera de nitrógeno y oscuridad y se centrifugó a 20.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se separó la fase orgánica y se repitió el proceso de extracción sobre la fase acuosa 2 veces más, mediante la adición de alícuotas de 10 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos obtenidos se combinaron y concentraron a sequedad en un rotavapor a vacío a 30°C. El residuo se reconstituyó con 5 mL de diclorometano. Todo el proceso se llevó a cabo en total ausencia de luz y atmósfera de nitrógeno. Los extractos se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 μm . A continuación se realizaron distintas diluciones con concentraciones finales de 75, 50 y 25 mg/mL de muestra.

Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). Para la evaluación del TEAC de los extractos hidrofílicos se realizó una dilución con PBS de la solución del radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ hasta conseguir una absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a una longitud de onda de 734 nm. En el caso de los extractos lipofílicos se utilizó etanol, por la escasa solubilidad del trolox en diclorometano. Se tomaron 20 μL de extracto y se adicionaron a una cubeta de cuarzo que contenía 1980 μL del radical. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 30°C y se leyó de forma paralela un control (radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$), cuya absorbancia estuvo comprendida entre $0,70 \pm 0,02$, y un blanco que fue el solvente (PBS o diclorometano para extractos hidrofílicos o lipofílicos, respectivamente). La lectura de absorbancia se realizó durante 10 minutos. Para la determinación del TEAC de cada muestra se elaboró una recta de calibrado con el patrón Trolox utilizando tampón fosfato salino (extractos hidrofílicos) o etanol (extractos

lipofílicos) como diluyente. Las concentraciones de las soluciones utilizadas en dicha recta fueron 1,5; 4,0; 5,0; 10,0 y 15 μM . Se representó gráficamente el porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ con respecto a la concentración de trolox evaluado a los 10 minutos, como se refleja en las siguientes Figuras:



Para calcular la actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) se relacionó la pendiente obtenida a partir de la representación gráfica de la concentración de extracto ensayado con el porcentaje de inhibición de absorbancia del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a un tiempo de 10 minutos y la pendiente obtenida a partir

del trolox. Se define el TEAC como los μmoles de trolox equivalentes a un gramo de muestra de partida, expresado en sustancia seca.

4.2.7. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados de acuerdo con el apartado 3.2.5.

4.3. Resultados sobre la obtención de harinas funcionales de judías mediante fermentación

El presente trabajo forma parte de los proyectos de investigación: “Optimización de procesos de fermentación para la obtención de nuevos alimentos funcionales de leguminosas. Valoración química, (AGL 2000-1609-C02-01)” y “Procesos biotecnológicos para incrementar la capacidad antioxidante de leguminosas, CICYT (AGL 2002-02905 ALI)”. La finalidad de este trabajo ha sido la obtención de harinas funcionales de judías mediante fermentación ácido láctica, de forma natural o con adición de cultivos iniciadores. En primer lugar, se ha llevado a cabo la optimización del proceso de fermentación para, a continuación, obtener y valorar harinas funcionales de judías.

4.3.1. Optimización del proceso de fermentación de judías

Se llevaron a cabo una serie de ensayos a pequeña escala con la finalidad de optimizar el proceso de fermentación ácido láctica sobre la reducción de factores antinutritivos de acuerdo con las siguientes variables: tipo de fermentación, tiempo de fermentación y concentración de harina.

Los códigos de las muestras estudiadas son los siguientes:

- ♦ J: judías crudas
- ♦ JP: judías preparadas para el proceso de fermentación
- ♦ FNP: harina de judías obtenidas a pequeña escala mediante fermentación natural.
- ♦ FFP: harina de judías obtenidas a pequeña escala mediante fermentación con *Lactobacillus fermentum*.

- FFP: harina de judías obtenidas a pequeña escala mediante fermentación con *Lactobacillus plantarum*.

Para optimizar el proceso de fermentación se comenzó por la elección del tipo de inóculo: *Lactobacillus fermentum* o *Lactobacillus plantarum*. Se llevaron a cabo una serie de fermentaciones en pequeña escala durante un periodo de tiempo de 0-96h con una concentración de 220 g/ L (harina / agua destilada).

En la Tabla 25 se recogen los resultados obtenidos en función del tiempo de proceso sobre los cambios producidos en el pH y flora microbiológica en las judías funcionales obtenidas mediante fermentación con *Lactobacillus fermentum* o con *Lactobacillus plantarum*.

Tabla 25. Efecto del tipo de fermentación sobre el pH y flora microbiana de judías*.

Tipo de fermentación	Tiempo de Fermentación (h)	pH	Recuento de viables (ufc/ml)		
			Bacterias Ácido Lácticas	Bacterias Mesófilo Aeróbicas	Mohos y Levaduras
FFP	0	6,0	1×10^6	1×10^6	1×10^3
	24	4,1	1×10^7	6×10^7	$< 1 \times 10^4$
	48	4,0	3×10^8	1×10^8	$< 1 \times 10^4$
	72	4,0	1×10^8	1×10^8	$< 1 \times 10^4$
	96	4,5	3×10^7	6×10^8	$< 1 \times 10^4$
FPP	0	6,0	6×10^7	5×10^7	1×10^3
	24	3,8	5×10^9	6×10^9	$< 1 \times 10^4$
	48	3,5	5×10^8	1×10^9	$< 1 \times 10^4$
	72	3,5	1×10^6	1×10^6	$< 1 \times 10^4$
	96	3,5	$< 1 \times 10^5$	$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^4$

*) < significa que la dilución que se indica es la más baja probada.

Valores medios de 2 procesos de fermentación.

En las harinas fermentadas con *Lactobacillus fermentum* (FFP), el pH a las 24 h del proceso descendió a 4,1, valor que permaneció constante hasta las 72 h, subiendo a 4,5 a las 96 h. Cuando la fermentación se realizó con *Lactobacillus plantarum* (FPP), el pH descendió a las 48 h a 3,5 permaneciendo estable hasta las 96 h. Las bacterias ácido lácticas presentes en FFP y FPP a tiempo 0 dan una estimación de la población del inóculo presente. El recuento de viables en FFP está subestimado debido a las cadenas de células formadas por *Lactobacillus fermentum*. Los valores máximos de células para FFP se obtienen después de 48h mientras que para FPP se alcanza entre 24 h y 48h (Tabla 25).

En la Tabla 26 se recoge el efecto de la fermentación con *Lactobacillus fermentum* o con *Lactobacillus plantarum* llevada a cabo durante 96 h sobre el contenido en factores antinutritivos de *Vigna sinensis* var. Carilla.

Tabla 26. Efecto del tipo de fermentación sobre el contenido en factores antinutritivos de judías

	J	FPP	FFP
<i>α-Galactósidos (g/100g s.s.)</i>			
Rafinosa	0,35±0,02 ^b	ND ^a	ND ^a
Estaquiosa	4,64±0,04 ^c	ND ^a	ND ^a
Total α-galactósidos	4,98±0,03 ^c	ND ^a	ND ^a
<i>Inositol fosfatos (g/100 s.s.)</i>			
Inositol hexafosfato	0,34±0,01 ^c	ND ^a	ND ^a
Inositol pentafofosfato	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Inositol tetrafosfato	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Total inositol fosfatos	0,34±0,01 ^b	ND ^a	ND ^a
TIA (TIU/mg s.s.)	12,32±0,26 ^c	6,43±0,57 ^a	6,38±0,16 ^a

*) Valores medios de 4 determinaciones ± desviación standard; Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas; ND= No detectado.

El proceso de fermentación realizado con *Lactobacillus fermentum* o con *Lactobacillus plantarum* afectó considerablemente al contenido en factores antinutritivos de las judías. En las harinas funcionales de *Vigna sinensis* var. Carilla, se observa la desaparición de α-galactósidos y de inositol fosfatos y una reducción del ~50% de la actividad inhibidora de tripsina.

El *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 es un lactobacilo heterofermentativo facultativo que fermenta casi exclusivamente hexosas a ácido láctico. El *Lactobacillus fermentum* CECT 5153 es un microorganismo obligadamente heterofermentativo que fermenta hexosas a ácido láctico, ácido acético y CO₂. Esta producción de gas procedente de las hexosas, junto con las peores propiedades sensoriales de las judías fermentadas, nos condujeron a elegir al *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 como cultivo iniciador en las siguientes fermentaciones.

A continuación se llevaron a cabo una serie de fermentaciones (natural o con *Lactobacillus plantarum*) en las que se aumentó la concentración a 300g/L, con objeto de conseguir mayor cantidad de harinas funcionales de judías, durante un periodo de tiempo de 48 h y 96 h. Los resultados obtenidos sobre el efecto de la fermentación en el contenido en factores antinutritivos de *Vigna sinensis* var. Carilla se recogen en la Tabla 27.

Tabla 27. Efecto de distintas condiciones de fermentación sobre los factores antinutritivos de judías

J		FNP (300 g/L, 48 h)	FNP (300 g/L, 96 h)	FPP (300 g/L, 48 h)	FPP (300 g/L, 96 h)
<i>α-Galactósidos (g/100g s.s.)</i>					
Rafinosa	0,35±0,02 ^c	ND ^a	ND ^a	0,24±0,02 ^b	ND ^a
Estaquiosa	4,64±0,04 ^d	0,37±0,03 ^c	0,16±0,01 ^a	0,36±0,03 ^c	0,23±0,05 ^b
Total α-galactósidos	4,98±0,03 ^e	0,37±0,03 ^c	0,16±0,01 ^a	0,60±0,04 ^d	0,23±0,05 ^b
<i>Inositol fosfatos (g/100 s.s.)</i>					
Inositol hexafosfato	0,34±0,01 ^d	0,09±0,01 ^c	ND ^a	0,07±0,01 ^b	ND ^a
Inositol pentafofato	ND ^a	0,06±0,01 ^b	ND ^a	0,05±0,01 ^b	ND ^a
Inositol tetrafofato	ND ^a	0,04±0,00 ^b	ND ^a	0,04±0,01 ^b	ND ^a
Total inositol fosfatos	0,34±0,01 ^c	0,18±0,01 ^b	ND ^a	0,16±0,02 ^b	ND ^a
TIA (TIU/mg s.s.)	12,32±0,26 ^d	7,58±0,65 ^{bc}	6,94±0,28 ^b	8,33±0,79 ^c	5,19±0,20 ^a

*) Valores medios de 4 determinaciones ± desviación standard; Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas; ND= No detectado.

El proceso de fermentación llevado a cabo de forma natural (FNP) o con *L. plantarum* (FPP) durante 48 h, produjo una reducción del contenido en α-galactósidos, actividad inhibidora de tripsina y ácido fítico (IP₆) de 92%-88%, 38%-32% y 74%-76%, respectivamente. Por otra parte, se observó la aparición de otros inositol fosfatos menos fosforilados (IP₅ e IP₄), no detectados en las judías crudas. Cuando el proceso de fermentación se prolongó a 96 h, el descenso en α-galactósidos y actividad inhibidora de tripsina fue más acusado (97-95% y 44-58%, respectivamente) y los inositol fosfatos desaparecieron completamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se eligió como tiempo óptimo de fermentación 48 h, debido a que es un periodo de tiempo corto y aunque el descenso en el contenido en factores antinutritivos después de 96 h es algo más acusado, cuando el tiempo de fermentación es de 48 h, se encontraron presentes los inositol fosfatos menos fosforilados, compuestos bioactivos que pueden jugar un papel muy importante desde un punto de vista fisiológico.

Con respecto a la optimización de la concentración de harina de judías en el proceso de fermentación (220 g/L o 300g/L), se observó que comparando los resultados obtenidos sobre el efecto en el contenido en factores antinutritivos (Tablas 26 y 27), la concentración adecuada fue la de 300g/L por idénticas razones especificadas anteriormente en la elección del tiempo óptimo.

Se seleccionaron como condiciones óptimas de fermentación las siguientes:

-Tipo de fermentación $\left\{ \begin{array}{l} \text{Natural} \\ \text{Inóculo } Lactobacillus plantarum \end{array} \right.$

-Concentración de la suspensión de harina: 300 g/L

-Tiempo de fermentación: 48 h

4.3.2. Valoración de harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación

Se obtuvieron harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) mediante fermentación natural o con *Lactobacillus plantarum* en las condiciones óptimas establecidas: concentración de harina de judías/agua (300g/L) y durante un periodo de tiempo de 48 h. Posteriormente, dichas harinas se sometieron a tratamiento en autoclave con el fin de reducir el contenido en factores termolábiles como los inhibidores de tripsina.

Los códigos de las muestras estudiadas son los siguientes:

- ♦ J: judías crudas
- ♦ JP: judías preparadas para la fermentación
- ♦ FN: harina de judías fermentadas de forma natural en condiciones óptimas
- ♦ FNA: harina de judías fermentadas de forma natural en condiciones óptimas y posterior tratamiento en autoclave.
- ♦ FP: harina de judías fermentadas con *L. plantarum* en condiciones óptimas
- ♦ FPA: harina de judías fermentadas con *L. plantarum* en condiciones óptimas y posterior tratamiento en autoclave.

4.3.2.1. Valoración microbiológica de harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones

En la Tabla 28 se recogen los resultados obtenidos sobre pH y flora microbiológica de las harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones.

Tabla 28. Efecto de las condiciones óptimas de fermentación en el pH y flora microbiológica de judías

Tipo de fermentación	Tiempo de Fermentación (h)	pH	Recuento de viables (ufc/ml)		
			Bacterias Ácido Lácticas	Bacterias Mesófilo Aeróbicas	Mohos y Levaduras
FN	0	6,5	1×10^3	2×10^4	1×10^2
	48	4,5	2×10^9	1×10^9	1×10^2
FP	0	6,5	6×10^7	1×10^7	1×10^2
	48	4,0	5×10^6	1×10^6	$< 1 \times 10^2$

*) < significa que la dilución que se indica es la más baja probada.

Valores medios de 2 procesos de fermentación.

El pH descendió en FN y FP de 6,5 a 4,5-4,0, respectivamente, después de 48 h de fermentación. Varios autores han puesto de manifiesto que durante la fermentación ácido láctica de leguminosas, es la bacteria ácido láctica la que juega el papel más relevante en el descenso del pH (Wang y Hesseltine, 1981; Raggae y col. 1986; Barampana y Simard, 1995; Frías y col. 1999).

En las cepas aisladas en NF después de 48 h se encontraron diferentes géneros de *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp. Las colonias de bacterias ácido lácticas y bacterias mesófilo aeróbicas aisladas en PF fueron siempre las del inóculo *L. plantarum* ATCC 14917, lo que indica que esta bacteria se implantó predominantemente en las judías durante la fermentación. Fue escaso el crecimiento de mohos y levaduras tanto en las harinas fermentadas de forma natural como con *L. plantarum*, produciéndose un descenso más acusado en PF después de 48 h. Tanto en las harinas de judías antes de fermentar como después

de la fermentación la presencia de enterobacterias y clostridios sulfito-reductores fueron <1 ufc/mL, asegurando la calidad higiénico-sanitaria de dichas harinas.

Reddy y col. (1982) observaron que durante el proceso de fermentación, las bacterias ácido lácticas que producen ácido láctico a partir de hexosas, disminuyen el pH hasta niveles próximos a 4, hecho que mejora la conservación del producto final. De acuerdo con Gibbs (1987) y Svanberg y Lorri (1997), se inhibe el crecimiento de patógenos que causan diarrea en los productos de consumo cuando el pH es próximo a 4. Otros autores como Nout y col. (1989) y Steinkraus (1987) observaron que los cultivos puros de microorganismos fermentativos (como las bacterias ácido lácticas, homo o heterofermentativas), crecen rápidamente en la mayoría de los alimentos utilizados como sustratos, disminuyendo el pH y evitando el crecimiento de otros microorganismos competitivos.

4.3.2.2. Valoración química de las harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación

En las harinas funcionales de judías se analizó el contenido en carbohidratos solubles disponibles (monosacáridos y disacáridos), almidón total y disponible, vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina C, carotenoides, tocoferoles y en factores antinutritivos (α -galactósidos, inositol fosfatos y actividad inhibidora de tripsina).

En las Tablas 29 y 30 se recogen los datos obtenidos sobre el contenido en nutrientes y factores antinutritivos en judías crudas y en las harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación y sometidas a autoclave.

Tabla 29. Efecto del proceso de fermentación en condiciones óptimas sobre el contenido en nutrientes de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla).

Nutrientes	J	JP	FN	FNA	FP	FPA
Fructosa (g/100 g s.s.)	ND*	ND*	1,42±0,10 ^d	1,41±0,02 ^d	0,41±0,03 ^c	0,21±0,02 ^b
Glucosa (g/100 g s.s.)	ND*	ND*	0,55±0,05 ^c	0,42±0,05 ^d	0,38±0,01 ^c	0,35±0,02 ^b
Galactosa (g/100 g s.s.)	ND*	ND*	1,24±0,08 ^d	0,60±0,04 ^b	0,81±0,03 ^c	0,55±0,04 ^b
Sacarosa (g/100 g s.s.)	2,33±0,02 ^f	1,92±0,08*	0,73±0,03 ^d	0,62±0,04 ^c	0,36±0,04 ^b	0,24±0,02*
Almidón total (g/100 g s.s.)	51,77±0,42*	54,94±0,85 ^d	48,54±0,85 ^b	43,41±0,25*	48,47±0,22 ^b	43,63±0,64*
Almidón disponible (g/100 g s.s.)	49,73±0,42 ^d	53,40±0,27*	43,76±0,53 ^b	40,67±0,55*	47,22±0,66 ^c	40,15±0,48*
Carbohidratos disponibles totales (g/100 g s.s.)	52,06±0,42 ^c	55,32±0,27 ^c	45,73±0,41 ^b	42,02±0,33*	51,16±0,58 ^b	48,20±0,55*
Tiamina (mg/100 g s.s.)	1,64±0,13*	0,73±0,08 ^c	0,51±0,07 ^b	0,32±0,09*	0,94±0,01 ^d	0,72±0,11 ^c
Riboflavina (mg/100 g s.s.)	0,28±0,01*	0,24±0,01*	0,58±0,08 ^d	0,37±0,05 ^b	0,54±0,03 ^d	0,45±0,01 ^c
Vitamina C (mg/100 g s.s.)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
Carotenoides (µg/100 g s.s.)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
β-Tocoferol (mg/100 g s.s.)	ND*	ND*	0,11±0,00 ^b	0,04±0,02 ^{ab}	0,28±0,05 ^c	0,28±0,06 ^c
γ-Tocoferol (mg/100 g s.s.)	0,43±0,02*	0,31±0,02 ^d	0,17±0,02 ^c	0,14±0,01 ^b	0,10±0,01*	0,09±0,01*
δ-Tocoferol (mg/100 g s.s.)	1,83±0,11*	1,35±0,10 ^d	1,00±0,10 ^c	0,61±0,01 ^b	0,61±0,05 ^b	0,50±0,09*
Actividad α-TEs/100g	0,10±0,01 ^b	0,07±0,01*	0,10±0,00 ^b	0,05±0,01*	0,16±0,02 ^c	0,17±0,01 ^c

Valores medios ± desviación estándar de 4 determinaciones; ND= No detectado. Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas (P≤0,05).

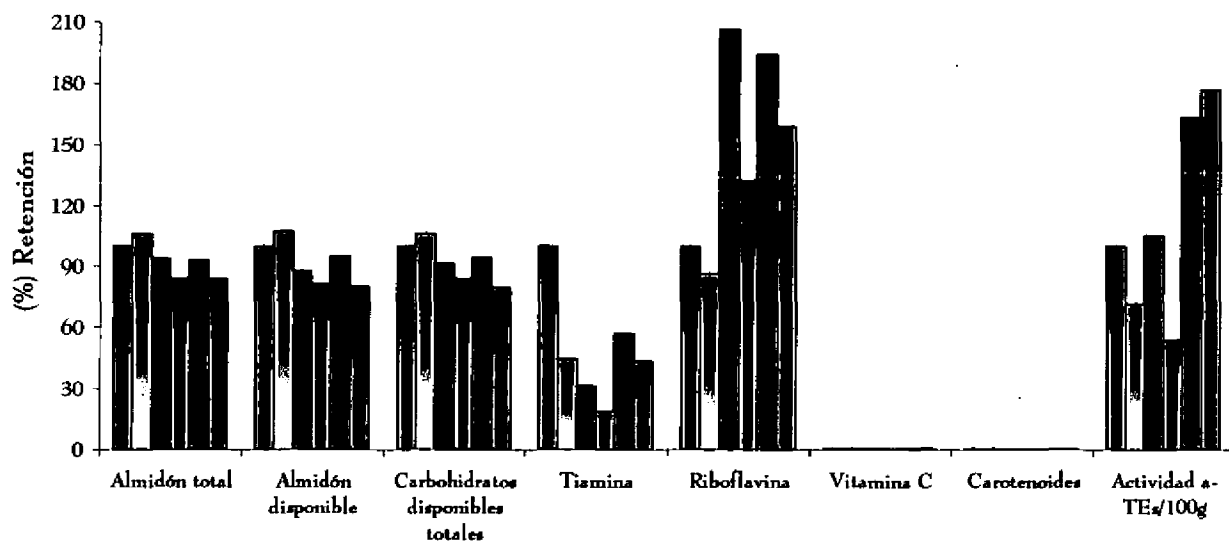
Tabla 30. Efecto del proceso de fermentación en condiciones óptimas sobre el contenido en factores antinutritivos de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla).

Factores antinutritivos	J	JP	FN	FNA	FP	FPA
Rafinosa (g/100g s.s.)	0,35±0,02 ^c	0,36±0,01 ^c	0,07±0,01 ^a	0,10±0,00 ^b	0,11±0,01 ^b	0,06±0,01 ^a
Estaquiosa (g/100g s.s.)	4,64±0,04 ^a	3,91±0,04 ^d	0,18±0,02 ^a	0,20±0,03 ^a	0,52±0,01 ^c	0,47±0,01 ^b
Total α-galactósidos (g/100g s.s.)	4,98±0,03 ^f	4,28±0,03 ^c	0,25±0,01 ^a	0,31±0,03 ^b	0,63±0,01 ^d	0,53±0,02 ^c
Inositol hexafosfato (g/100g s.s.)	0,34±0,01 ^c	0,23±0,10 ^b	0,05±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a
Inositol pentafosfato (g/100g s.s.)	ND ^a	0,08±0,01 ^d	0,03±0,01 ^b	0,03±0,00 ^a	0,02±0,01 ^c	0,03±0,01 ^c
Inositol tetrafosfato (g/100g s.s.)	ND ^a	ND ^a	0,06±0,01 ^d	0,05±0,01 ^c	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b
Total inositol fosfatos (g/100g s.s.)	0,34±0,01 ^c	0,34±0,02 ^c	0,13±0,03 ^b	0,13±0,02 ^b	0,09±0,00 ^a	0,10±0,02 ^a
TIA (TIU/mg s.s.)	12,32±0,26 ^a	9,21±0,18 ^d	6,12±0,21 ^c	2,54±0,29 ^a	9,00±0,22 ^d	5,47±0,13 ^b

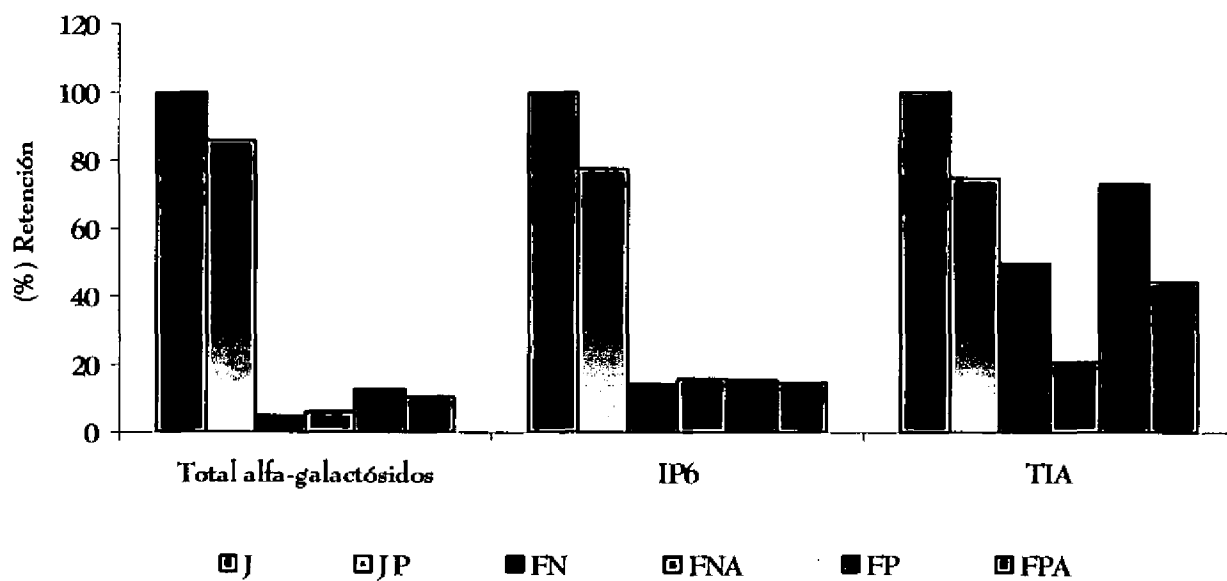
Valores medios ± desviación estándar de 4 determinaciones; ND= No detectado. Idéntico superíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Gráfico 7: Porcentaje de retención de nutrientes y factores antinutritivos de harinas funcionales de judías fermentadas (*Vigna sinensis* var. Carilla)

a) Nutrientes



b) Factores antinutritivos



Durante la preparación de las harinas para el proceso de fermentación (JP) se observaron cambios en el contenido en nutrientes y en factores antinutritivos con respecto a las judías crudas. El contenido en sacarosa disminuyó, mientras que se incrementó el de almidón total, disponible y carbohidratos disponibles totales. Los niveles vitamínicos disminuyeron. Con respecto al contenido en factores antinutritivos se observó un ligero descenso en α -galactósidos y ácido fítico, siendo más acusado el de la actividad inhibidora de tripsina (Tabla 29, Gráfico 7b).

En las harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación, se observaron cambios en el contenido en nutrientes y en factores antinutritivos estudiados.

El contenido en sacarosa disminuyó, apareciendo los monosacáridos fructosa, glucosa y galactosa, como consecuencia de la hidrólisis de sacarosa y α -galactósidos durante la fermentación natural o con *L. plantarum*.

El contenido en almidón total y disponible y carbohidratos solubles disponibles descendió en las harinas funcionales de judías obtenidas con fermentación natural (6%, 12% y 12%, respectivamente) y con *L. plantarum* (6%, 5% y 2% respectivamente). Estos descensos fueron más acusados cuando las harinas se sometieron a calentamiento en autoclave (Tabla 29, Gráfico 7a). El descenso en los niveles de almidón podría ser debido a la activación de α -amilasas endógenas de las semillas de judías, que hubieran hidrolizado este compuesto, o bien a su utilización como fuente de carbono por los microorganismos implicados en la fermentación.

El contenido en tiamina disminuyó en las harinas funcionales de judías (68% en FN y 42% en FP, respectivamente), descenso que fue más acusado cuando se sometieron a autoclave (80% y 56% en FNA y FPA, respectivamente), debido a que es una vitamina termolábil. El contenido en riboflavina se

incrementó en las harinas funcionales FN y FP (107% y 92% respectivamente), aumento que fue menos pronunciado en las harinas fermentadas tratadas con autoclave (32% en FNA y 60% en FPA). En las harinas funcionales de judías obtenidas no se detectó la presencia de vitamina C ni de carotenoides, mientras que la actividad vitamínica E aumentó (60%) en las que se obtuvieron con *L. plantarum* (Tabla 29, Gráfico 7a). El incremento observado en las harinas funcionales de judías podría deberse a síntesis por parte de los microorganismos implicados en el proceso de fermentación.

Con respecto al contenido en factores antinutritivos, la fermentación de las judías (FN y FP) ocasionó descensos considerables en el contenido en α -galactósidos, inositol hexafosfato y actividad inhibidora de tripsina (95%-87%, 85% y 50%-26%, respectivamente). El calentamiento en autoclave de las harinas funcionales (FNA y FPA) supuso sólo ligeros cambios en el contenido en α -galactósidos y descensos muy acusados en la actividad inhibidora de tripsina (80% y 55%, respectivamente) (Tabla 29 y Gráfico 7b). Cabe señalar, por otra parte, que en las harinas funcionales de judías se observó la aparición de nuevas formas de inositol fosfatos menos fosforiladas como inositol pentafofosfato IP_5 y tetrafosfato IP_4 , ausentes en las judías crudas.

Como se ha puesto de manifiesto, las harinas funcionales de judías presentan un menor contenido en factores antinutritivos que pueden ser debido a distintos factores. El drástico descenso en α -galactósidos observado puede ser debido a la activación de las α -galactosidasas endógenas, propias de las semillas, durante la fermentación natural o con *L. plantarum* de las judías. Como quedó detallado en el apartado 2.3.1., la α -galactosidasa es la enzima responsable de la hidrólisis de los enlaces α -(1-6) entre moléculas de galactosa en los α -galactósidos, dando lugar a formas libres de este monosacárido y α -galactósidos de cadena más corta. Los descensos en los niveles de sacarosa pueden ser consecuencia de su hidrólisis a glucosa y fructosa gracias a otras enzimas

endógenas presentes en las semillas de las judías, como invertasas, que se hubieran activado durante la incubación de las harinas durante la fermentación.

La reducción tan considerable del contenido ácido fítico en las harinas funcionales de judías, se podría deber a la actuación de fitasas endógenas de las semillas, que se hubieran activado durante la fermentación. Como quedó detallado en el apartado 2.3.1., la fitasa es la enzima responsable de la desfosforilación de los fitatos y se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales. Esta enzima actúa de forma escalonada hidrolizando el inositol hexafosfato (IP_6) en inositol fosfatos menos fosforilados (IP_5 , IP_4 , IP_3 , IP_2 e IP), mio-inositol y fósforo libre, como se pone de manifiesto en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se detectaron los inositol fosfatos IP_5 e IP_4 , ausentes en las judías crudas.

Con respecto al descenso de la actividad inhibidora de tripsina en las harinas funcionales de judías, podría ello ser debido a la activación de peptidasas endógenas de las semillas, y a la termolabilidad de los inhibidores de tripsina en las harinas fermentadas que han sido sometidas a calentamiento en autoclave.

4.3.3. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN en patrones y en harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación natural

El ácido fítico y otros inositol fosfatos están presentes en las semillas en cantidades relativamente bajas (4 mg/g de fósforo). La mayor parte de este fósforo corresponde al ácido fítico (inositol hexafosfato) (3 mg/g), junto con inositol penta-fosfatos (0,5 mg/g), cantidades inferiores de inositol tetra-fosfatos como el $Ins(1,3,4,5)P_4$ y trazas de otros más fosforilados (piro-fosfatos) (Raboy, 2003). Cuando se llevan a cabo con leguminosas algunos procesos tales como fermentación o germinación suele disminuir la cantidad de ácido fítico, aumentando por el

contrario la presencia de inositol fosfatos menos fosforilados (inositol pentafofosfatos, inositol tetrafofosfatos, inositol trifosfatos, etc.) (Kozłowska y col. 1996; Granito y col. 2002, Vidal-Valverde y col. 2002; Raboy, 2003). Desde que se descubrió la significancia biológica del Ins (1,4,5)P₃ para el sistema de señalización celular, la presencia de estos derivados menos fosfatados de inositol puede tener interés nutricional.

Se vienen realizando considerables esfuerzos (Sandberg y Ahderinne, 1986; Sandberg y col. 1989) para separar cromatográficamente los numerosos isómeros de fitatos de inositol (cuatro inositol pentafofosfatos, trece inositol tetrafofosfatos, quince inositol trifosfatos, etc.). Los mejores resultados se han obtenido con HPIC (cromatografía iónica de alta eficacia, Carlsson y col. 1981) y requiere el empleo sucesivo de dos sistemas de elución con el sistema Dionex y la utilización de inositol fosfatos patrón que permitan identificar los picos. El sistema separa claramente penta-tetrafofosfatos, pero es menos eficaz a medida que la molécula de inositol está menos fosfatada (mono, di y trifosfatos de inositol). Por todo ello, nosotros nos propusimos indagar acerca de cuales pueden ser las posibilidades de una técnica espectroscópica como la resonancia magnética nuclear de protón, para profundizar en el análisis de la composición de esas mezclas de isómeros posicionales.

4.3.3.1. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ¹H en patrones

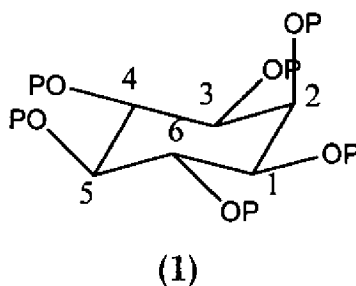
Dada la escasa información que existe en la bibliografía sobre los espectros de RMN de derivados puros de fosfatos de inositol (Cerdan y col. 1986; Philippy, 1989; Nakano y col. 2000; Tarelli, 2000) nos planteamos el estudio de mezclas cromatográficamente homogéneas para las que la información bibliográfica sería de gran utilidad. Con este fin, llevamos a cabo la hidrólisis de un patrón de fitato sódico (1,5 g/ 100 ml HCl 0,5 N, a ebullición durante 24 h). La mezcla

hidrolizada se hizo pasar por una columna de resina Dowex 1-X8 eluyendo con un gradiente de ácido clorhídrico diluído (0,52N, 0,50N, 0,38N, 0,32N, 0,28N, 0,15N y 0,08 N). El residuo que se obtuvo al evaporar estas fracciones, se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y posteriormente se obtuvo el espectro de RMN de ^1H . Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

Fracción F-0,52 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,52N. El análisis de HPLC indicó que esta fracción contenía ácido fítico mayoritariamente, y que había posibles inositol pentafosfatos de inositol.

El espectro de RMN de ^1H de esta fracción, se correspondió con bastante nitidez con el de IP_6 descrito por Nakano y col. 2000 (seguimos la convención de representar el D-myo-inositol) (Loewus y Murthy ,2000).

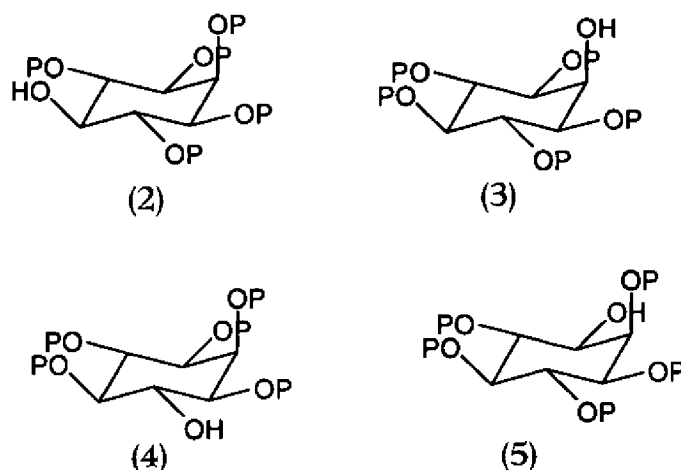


Así pues, las asignaciones de Nakano y col. 2000, se pudieron relacionar con las que se obtuvieron para la fracción F-0,52 patrón, tal como se puede apreciar en la Tabla 31, que indicaron la presencia de ácido fítico en esta fracción.

Tabla 31. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,52 patrón con la información bibliográfica

	Nakano y col. (1989) (ppm)	Fracción F-0,52 patrón
H-2	4,88(d)	4,77 (d)
H-4, H-6	4,47 (q)	4,35 (q)
H-1, H-3	4,27 (t, b)	4,19 (t, b)
H-5	4,27 (q)	4,19

En la Tabla 31 se aprecia un error sistemático entre los datos de RMN de ^1H de Nakano y col. (1989) y los obtenidos en nuestro laboratorio ($\pm 0,12$ ppm). Sin embargo, tal como se puede apreciar en el espectro de la fracción F-0,52 patrón (Fig. 19), junto a la señal que se apreció a 4,77 ppm y que asignamos al protón H-2 del ácido fítico, apareció otra señal a 4,63 ppm, que fué un claro indicio de que en la fracción F-0,52 patrón existe al menos un pentafofato. De los seis posibles inositol pentafofatos, la equivalencia de las posiciones C-1 y C-3, así como C-4 y C-6 reduce estas posibilidades a cuatro posibles isómeros distintos, que son los que recogemos en el siguiente esquema (estructuras 2 a 5). La pérdida de un grupo fofoato tiene el efecto de modificar el desplazamiento químico a valores más bajos. De ahí, que el único inositol pentafofato que pudo presentar una señal a 4,63 ppm fué el compuesto (3), donde la señal originada por H-2 pudo descender de 4,77 ppm a 4,63 ppm por pérdida del grupo fofoato del hidroxilo sobre C-2.



Este supuesto se confirmó por el análisis del espectro COSY de esta fracción. En este espectro (Fig. 20) se apreció que la señal de H-2 del ácido fítico estaba acoplada a la señal que apareció a 4,19 ppm (que se asignó a H-1 y H-3). Del mismo modo, la señal a 4,63 ppm apareció acoplada a señales a 4,20 ppm (asignable a H-1 y H-3). No se pudo excluir la presencia de inositol tetrafosfatos relacionados con el producto anterior (esto es, donde también se haya perdido el grupo fosfato sobre el hidroxilo de C-1 ó C-3) ya que la señal a 4,63 estuvo también acoplada a señales a 4,34 y 4,06 ppm.

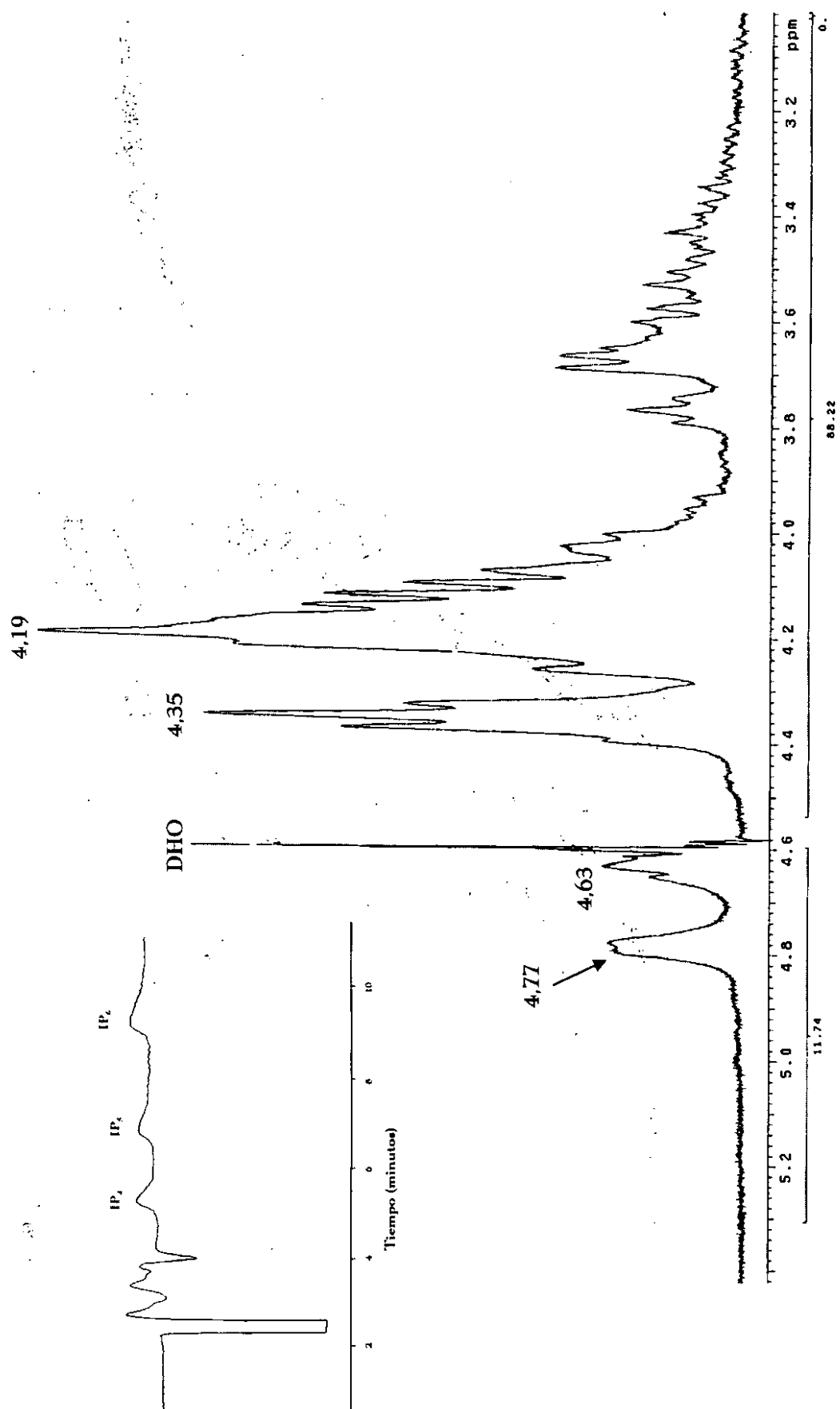


Figura 19. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,52 patrón

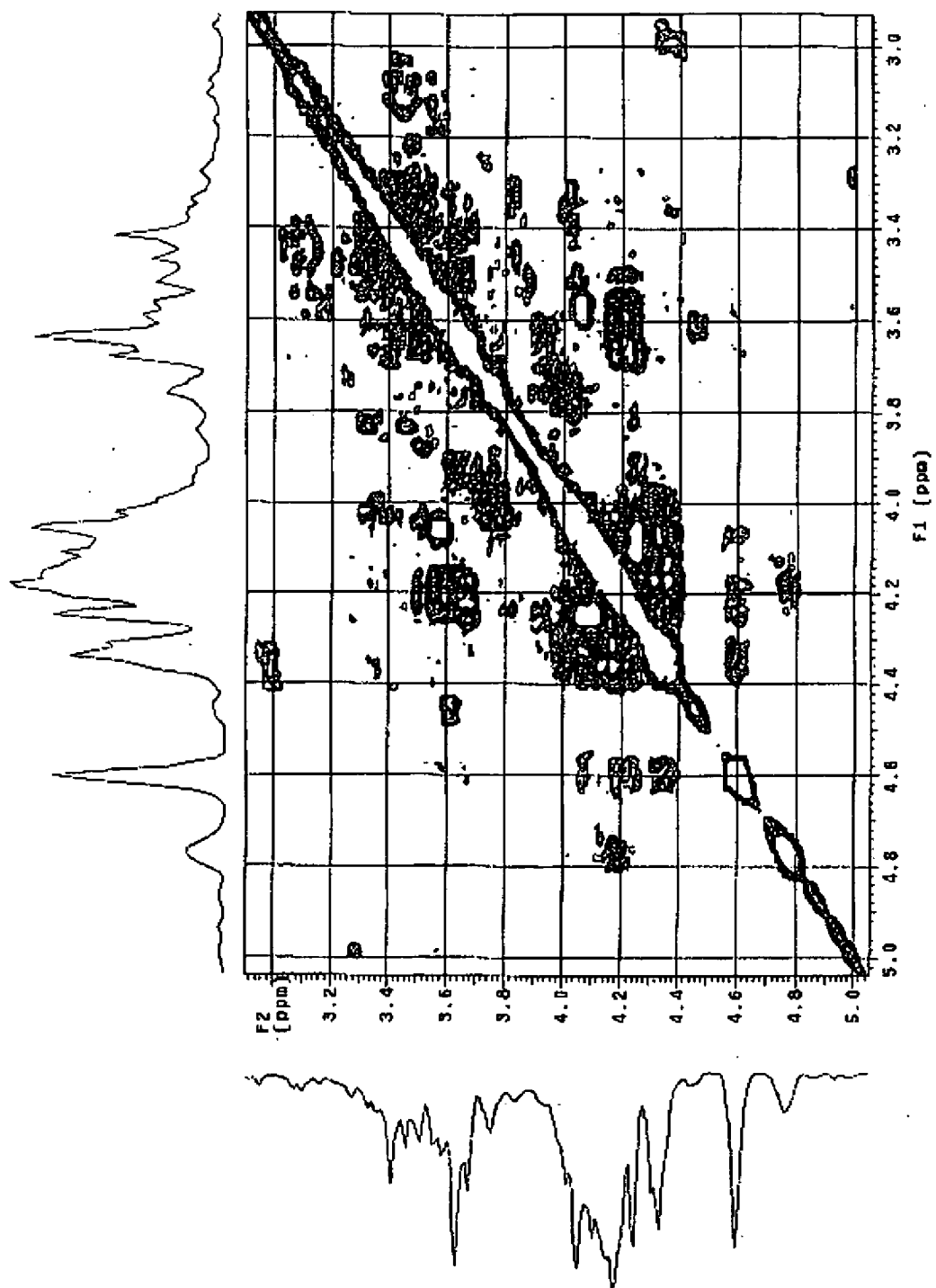


Figura 20. Espectro de COSY de los inositol fosfatos de la fracción F-0,52 patrón

Fracción F-0,50 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,50N, y tuvo una composición semejante a F-0,52 patrón, aunque enriquecida en inositol pentafofosatos (de acuerdo con el resultado de HPLC). En la Tabla 32, reseñamos los picos más importantes que se apreciaron en el espectro de RMN de ^1H de esta fracción (Fig. 21) y se compararon con datos publicados por Nakano y col. (2000) para un inositol pentafofosato y un inositol tetrafofosato.

Tabla 32. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,50 patrón con la información bibliográfica.

F-0,50 patrón (ppm); Intensidad relativa	(1,2,3,5,6) P_5 (4) (Nakano y col. 1989)	Ins(1,2,3,6) P_4 (Nakano y col. 1989)
4,74; 30	4,88 (d) H-2	4,84 H-2
4,64; 11		
4,29; 83		
4,15; 134	4,27 (t) H-3	4,30 H-4
4,13; 126		4,25 H-1
4,06; 99		
3,98; 83	4,11 (q) H-1; H-5	4,08 H-3
3,74; 80		
3,61; 94	3,75 (t) H-6	3,75 H-6
3,34; 23		3,50 H-5

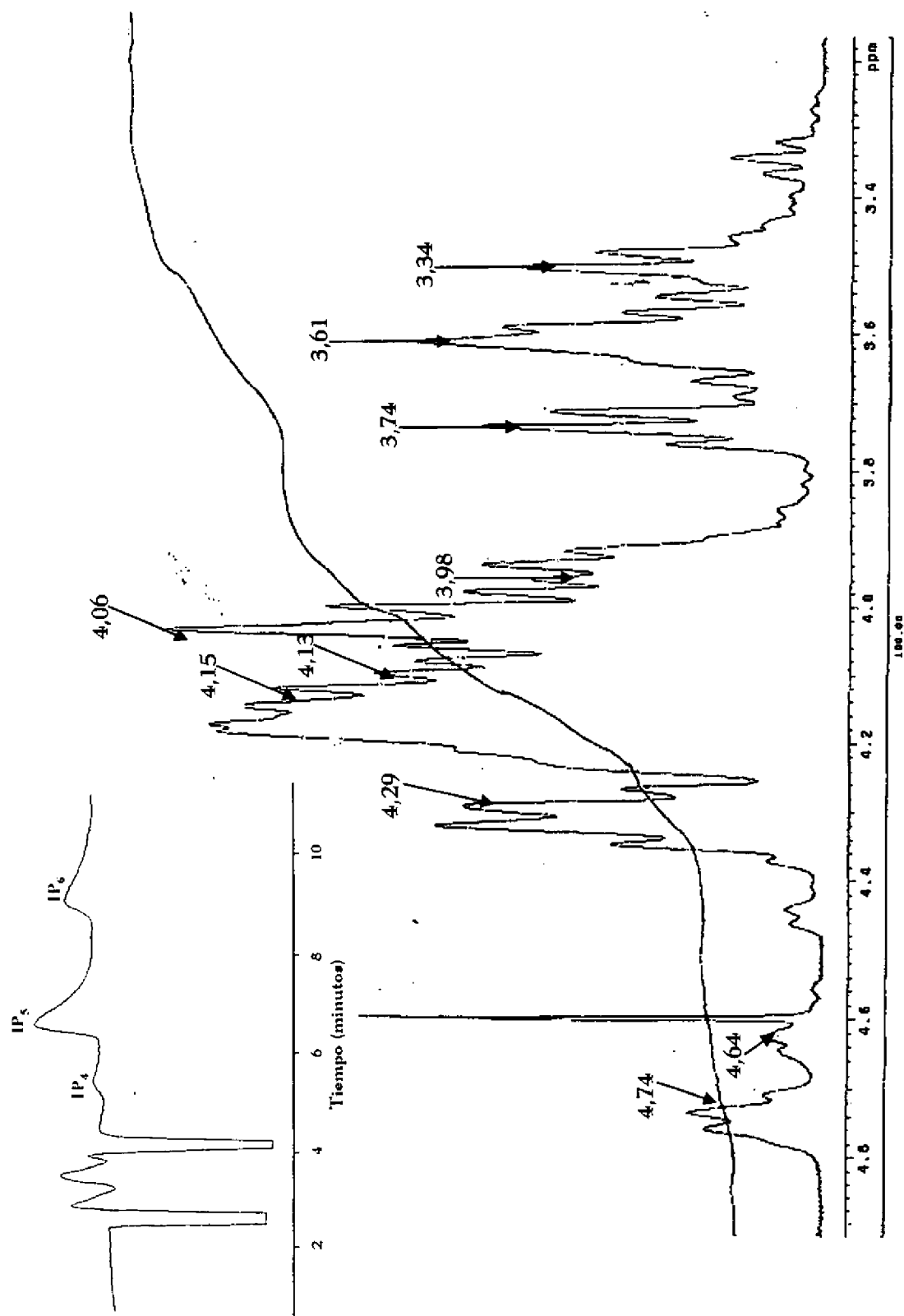


Figura 21. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,50 patrón

En la Tabla 32 se aprecia un error sistemático entre los datos de RMN de ^1H de Nakano y col. (1989) y los obtenidos en nuestro laboratorio (± 0.12 ppm). La complejidad del espectro de F-0,50 patrón indicó claramente que junto al inositol pentafofato (4), cuyas señales fueron posibles identificar en el espectro de F-0,50 patrón (Tabla 32), deben de existir otros. Como ya indicamos para la fracción F-0,52 patrón, la señal que se apreció a 4.64 ppm fue un claro indicio de la presencia del inositol pentafofato (3).

En consonancia con lo que indicó el cromatograma (HPLC) de esta fracción (presencia de inositol penta- e inositol tetrafofatos), fue posible identificar el contenido de, al menos, el inositol tetrafofato $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$ (Tabla 32), caracterizado por RMN por el citado grupo de Nakano y col.(1989).

Las señales en el entorno 4,70, 4,30 y 4,15 ppm pudieron asignarse indistintamente al inositol pentafofato (4) y al ácido fítico (1), pero las señales a 3,98 y 3,61 ppm deben corresponder al inositol pentafofato (4) y al inositol tetrafofato $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$, que además presentó otras señales características a 4,13 y 3,34 ppm.

Por tanto, de los datos de RMN de ^1H se pudo afirmar que en la fracción F-0,50 patrón estaban presentes, al menos, los compuestos (1), (3), (4) y el inositol tetrafofato $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$.

Fracción F-0,38 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,38N. El análisis mediante HPLC de esta fracción indicó la presencia mayoritaria de inositol pentafofatos, junto con inositol tetrafofatos. No apareció el ácido fítico.

Tabla 33. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,38 patrón con la información bibliográfica

F-0,38 patrón (ppm) Intensidad relativa	(1,2,3,5,6)P ₅ (4) (Nakano y col. 2000)	Ins(1,2,3,6)P ₄ (Nakano y col. 2000)	Ins(1,2,5,6)P ₄ (Philippy, 1989)
4,72; 25	4,88 (d) H-2	4,84 H-2	4,72 H-2
4,65; 20			
4,46; 8			4,44 H-4
4,30; 75	4,42 (q) H-4		
4,16; 155		4,30 H-4	4,15 H-1
4,13; 130	4,27 (t) H-3	4,25 H-1	
4,06; 110			
4,03; 120			
4,01; 148			4,00 H-5
3,98; 100	4,11 (q) H-1; H-5	4,08 H-3	3,95 H-6
3,91; 110			
3,71; 75			
3,61; 135	3,75 (t) H-6	3,75 H-6	3,60 H-3
3,51; 85			
3,36; 30		3,50 H-5	

En la Tabla 33 se recoge la información de los picos más significativos que se obtienen en el espectro RMN de ^1H de la fracción F-0,38 patrón (Fig. 22) y su comparación con datos bibliográficos conocidos para el inositol pentafofato (4) y dos de los inositol tetrafosfatos para los que encontramos este tipo de información: $\text{Ins}(1,2,3,6)\text{P}_4$ y $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$. Como ya hemos señalado anteriormente se apreció un error sistemático entre los datos de RMN de ^1H de Nakano y col. (1989) y los obtenidos por nosotros, mientras que no existía este error sistemático con los datos de Philippy (1989). Dado que el espectro que obtuvimos para la fracción F-0,38 patrón fue más complejo de lo que corresponde a la suma de los espectros de las sustancias identificadas, es lógico suponer que existían además, otros inositol pentafosfatos y, en particular, el $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ (3) que postulamos como el producto responsable de la señal que apareció a 4,65 ppm. No pudimos excluir la presencia de otro(s) inositol tetrafosfatos.

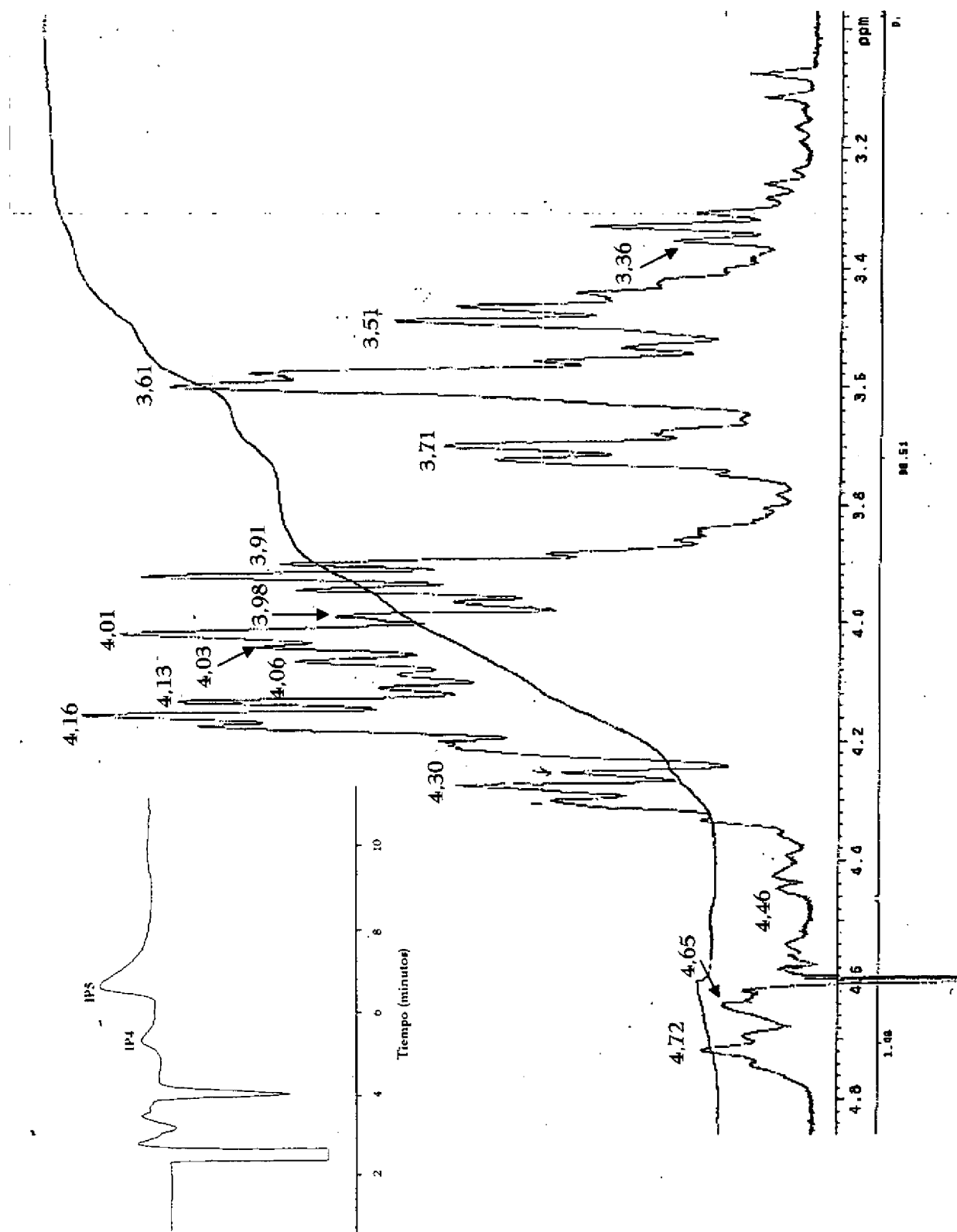


Figura 22. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,38 patrón

Fracción F-0,32 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,32N. El espectro de RMN de ^1H de esta fracción (Fig. 23) nos indicó que su composición fue similar a la fracción F-0,38 patrón, corroborando así el resultado de HPLC que indicó la presencia de penta- y tetra-inositol fosfatos. La observación más detallada del espectro de RMN mostró que han variado la intensidad de las señales, en particular se apreció una mayor intensidad de las señales en la zona baja del espectro (3,30 a 3,70 ppm), que fue un claro indicio de la presencia más acusada de inositol tetrafosfatos en esta muestra (en detrimento de los inositol pentafosfatos). La Tabla 34 que indicamos a continuación muestra las posibles asignaciones de este espectro.

Tabla 34. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,32 patrón con la información bibliográfica

F-32 (ppm); Intensidad relativa	Ins(1,2,5,6)P ₄ (Philippy, 2000)	Ins(1,2,3,6)P ₄ (Nakano y col. 2000)	Ins(1,3,4,5)P ₄ (Cerdan y col. 1986)
4,71; 24	4,72 H-2	4,84 H-2	
4,69; 17			
4,65; 16			
4,60; 10			
4,53; 11			
4,40; 16	4,44 H-4		4,38 H-4
4,26; 45			
4,19; 71		4,30 H-4	
4,14; 152	4,15 H-1	4,25 H-1	
4,12; 157			4,12 H-2
4,06; 88			4,08 H-3
4,01; 119	4,00 H-5		4,01 H-5, 4,00 H-1
3,94; 108	3,95 H-6	4,08 H-3	
3,92; 124			3,90 H-6
3,69; 93			
3,63; 16		3,75 H-6	
3,59; 146	3,60 H-3		
3,42; 109			
3,36; 26		3,50 H-5	
3,31; 73			

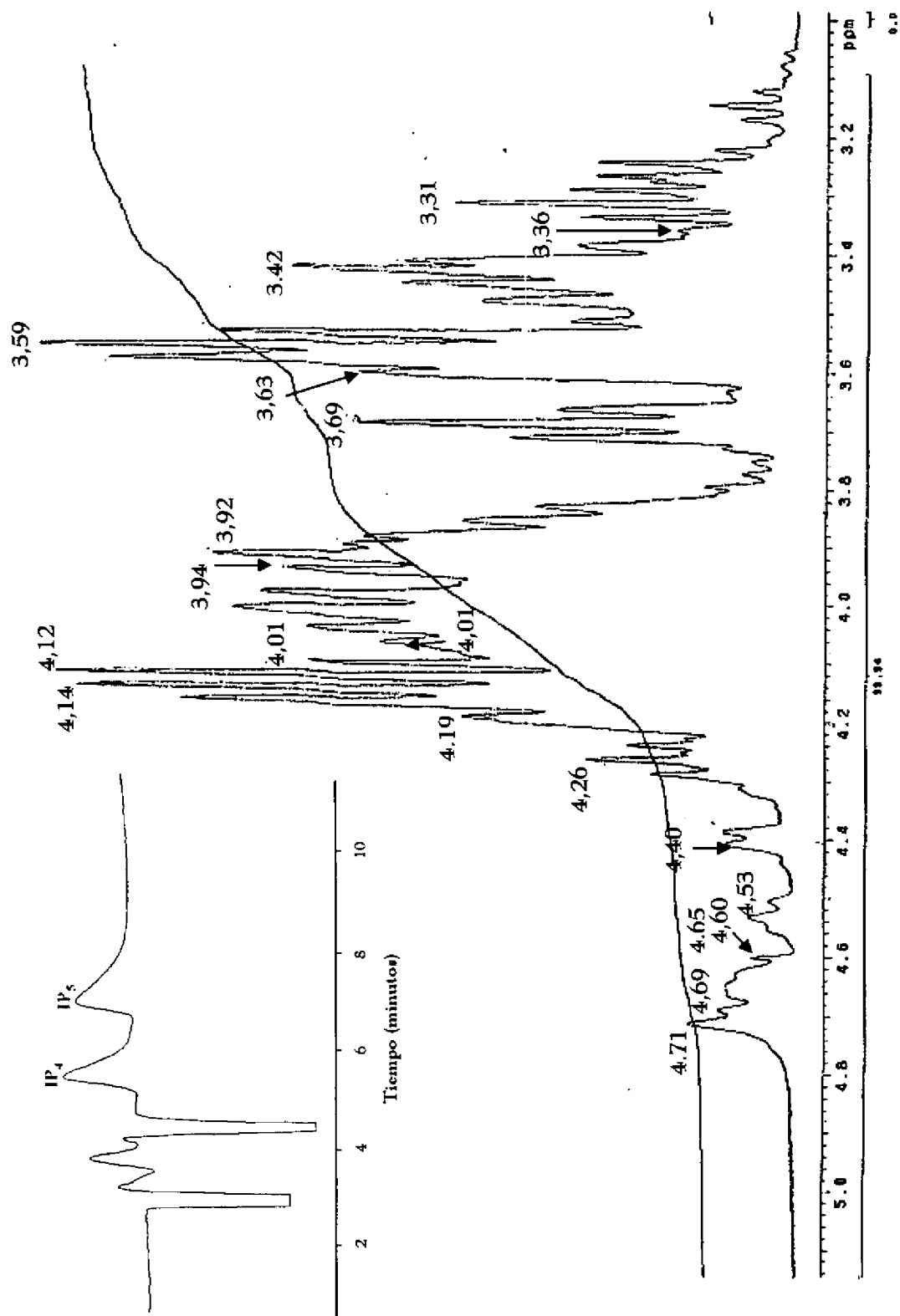


Figura 23. Espectro de RMN 1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,32 patrón

En la Tabla 34 se aprecia un error sistemático entre los datos de RMN de ^1H de Nakano y col. (2000) y los obtenidos en nuestro laboratorio ($\pm 0,12$ ppm), mientras que no se aprecia error sistemático con los datos de Philippy (1989) y Cerdan y col. (1986). Podemos afirmar que no estaba presente el (1,2,3,5,6) P_5 (4) descrito por Nakano y col. (1989), en cambio si pudo estar presente el Ins(1,3,4,5,6) P_5 (3) que postulamos como el producto responsable de la señal que apareció a 4,65 ppm. Se identificaron perfectamente las señales del Ins(1,2,5,6) P_4 descrito por Philippy (2000) y las del Ins(1,3,4,5) P_4 descrito por Cerdan y col. (1986). También se pudo asignar el espectro del Ins(1,2,3,6) P_4 de Nakano y col. (1989), aunque algunas de las señales asignables a este espectro fueron bastante más débiles (por ejemplo las señales a 3,63 y 3,36 ppm). El espectro COSY de esta fracción (Fig. 24) confirmó estas asignaciones.

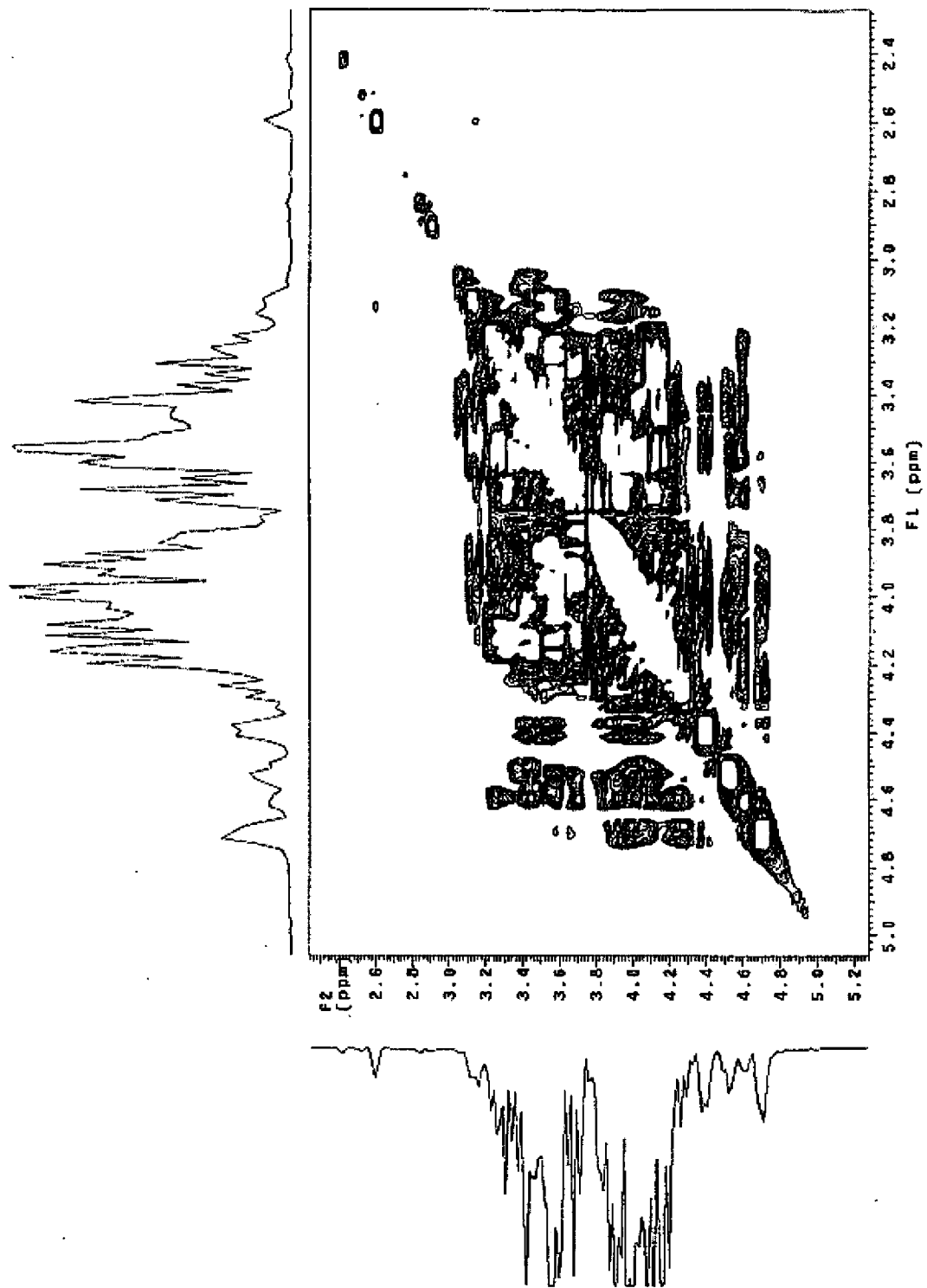


Figura 24. Espectro de COSY de los inositol fosfatos de la fracción F-0,32 patrón

Tabla 35. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,28 patrón con la información bibliográfica.

F-0,28 patrón (ppm) Intensidad relativa	Ins(1,2,5,6)P ₄ (Philippy, 2000)	Ins(1,3,4,5)P ₄ (Cerdan y col. 1986)	Ins(1,2,6)P ₃ (Nakano y col. 1989)	Ins(1,5,6)P ₃ (Philippy 1989)
4,72; 9	4,72 H-2			
4,70; 7				
4,62; 11				
4,54; 8			4,68 H-2	
4,40; 17	4,44 H-4	4,38 H-4		4,40 H-6
4,20; 30				4,23 H-2
4,18; 60				
4,14; 83	4,15 H-1		4,30 H-4	
4,12; 63		4,12 H-2		
4,08; 35		4,08 H-3		4,09 H-1
4,02; 85	4,00 H-5	4,01 H-5,		
4,00; 110			4,15 H-1	4,01 H-5
3,92; 56	3,95 H-6	3,90 H-6		
3,89; 91				
3,84; 48				3,84 H-4
3,69; 47				
3,67; 40				3,67 H-3
3,60; 71	3,60 H-3			
3,52; 79			3,68 H-6	
3,43; 91			3,58 H-3	
3,28; 68			3,48 H-5	

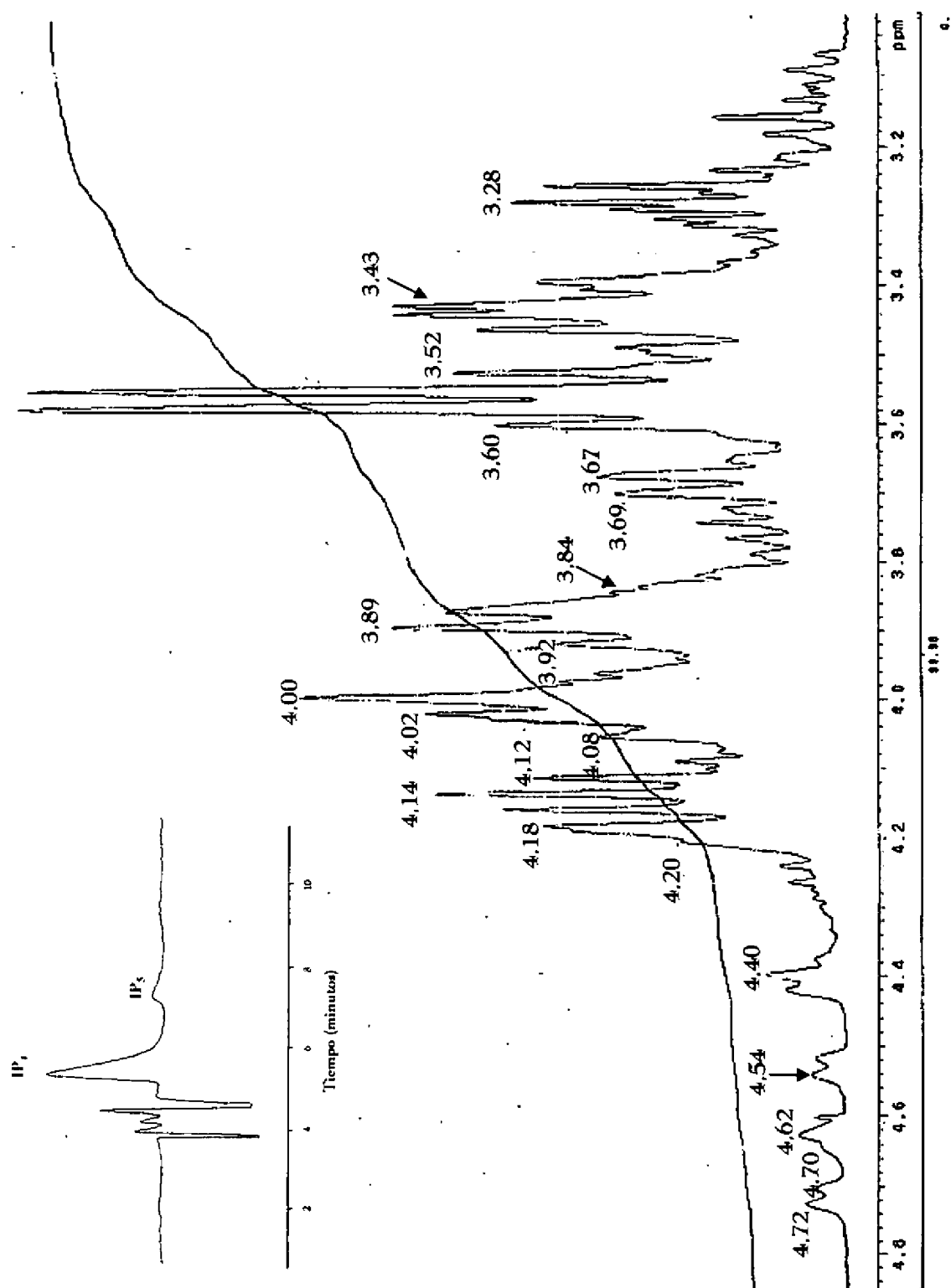


Figura 25. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,28 patrón

En la fracción F-0,28 patrón fue evidente la preponderancia del compuesto $\text{Ins}(1,2,5,6)\text{P}_4$ descrito por Philippy (o compuestos análogos) que presentaron señales a 3,59 ppm, ya que esta señal fue bastante más intensa (en términos relativos) en esta fracción que lo era en fracciones anteriores.

Precisamente teniendo en cuenta la presencia cualitativamente importante de señales en esta zona del espectro, no se pudo excluir la presencia de inositol trifosfatos tales como los descritos por Philippy (1989) $(1,5,6) \text{P}_3$ o el $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ de Nakano y col. (1989). El método de HPLC que utilizamos para analizar estas muestras tiene dificultades para separar los derivados de inositol menos fosfatados (inositol mono-, inositol di- e inositol trifosfatos), por lo que la asignación de señales de inositol trifosfatos (o sustancias menos fosfatadas) no pudo confirmarse por este método.

Fracción F-0,15 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,15N. La Tabla 36 recoge las señales más importantes del espectro de RMN de ^1H de esta fracción (Fig. 26).

Tabla 36. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,15 patrón con la información bibliográfica.

F-0,15 patrón (ppm); Intensidad relativa	Ins(1,5,6) P ₃ (Philippy 1989)	Ins(1,2,6) P ₃ (Nakano y col. 1989)	Ins(1,3,4,5) P ₄ (Cerdan y col. 1986)	Ins(1,4) P ₂ (Cerdan y col. 1986)	Ins(2) P ₁ (Tarelli, 2000)
4,62; 5					
4,54; 5		4,68 H-2			
4,40; 16	4,40 H-6		4,38 H-4		4,40 H-2
4,22; 29	4,23 H-2			4,23 H-2	
4,14; 25		4,30 H-4	4,12 H-2;	4,13 H-4	
4,09; 13	4,09 H-1		4,08 H-3		
4,01; 75	4,01 H-5	4,15 H-1	4,01; 4,00 H-5; H-1	3,93 H-1	
3,93; 20					
3,89; 31			3,90 H-6		
3,83; 68	3,84 H-4			3,83 H-6	
3,69; 26					
3,68; 26	3,67 H-3	3,68 H-6		3,67 H-3	
3,57; 128		3,58 H-3			3,60; 3,60 H-4; H-6
3,47; 79		3,48 H-5		3,48 H-5	
3,40; 115					3,41; 3,41 H-1; H-3
3,36; 50					
3,25; 34					
3,16; 18					3,16 H-5

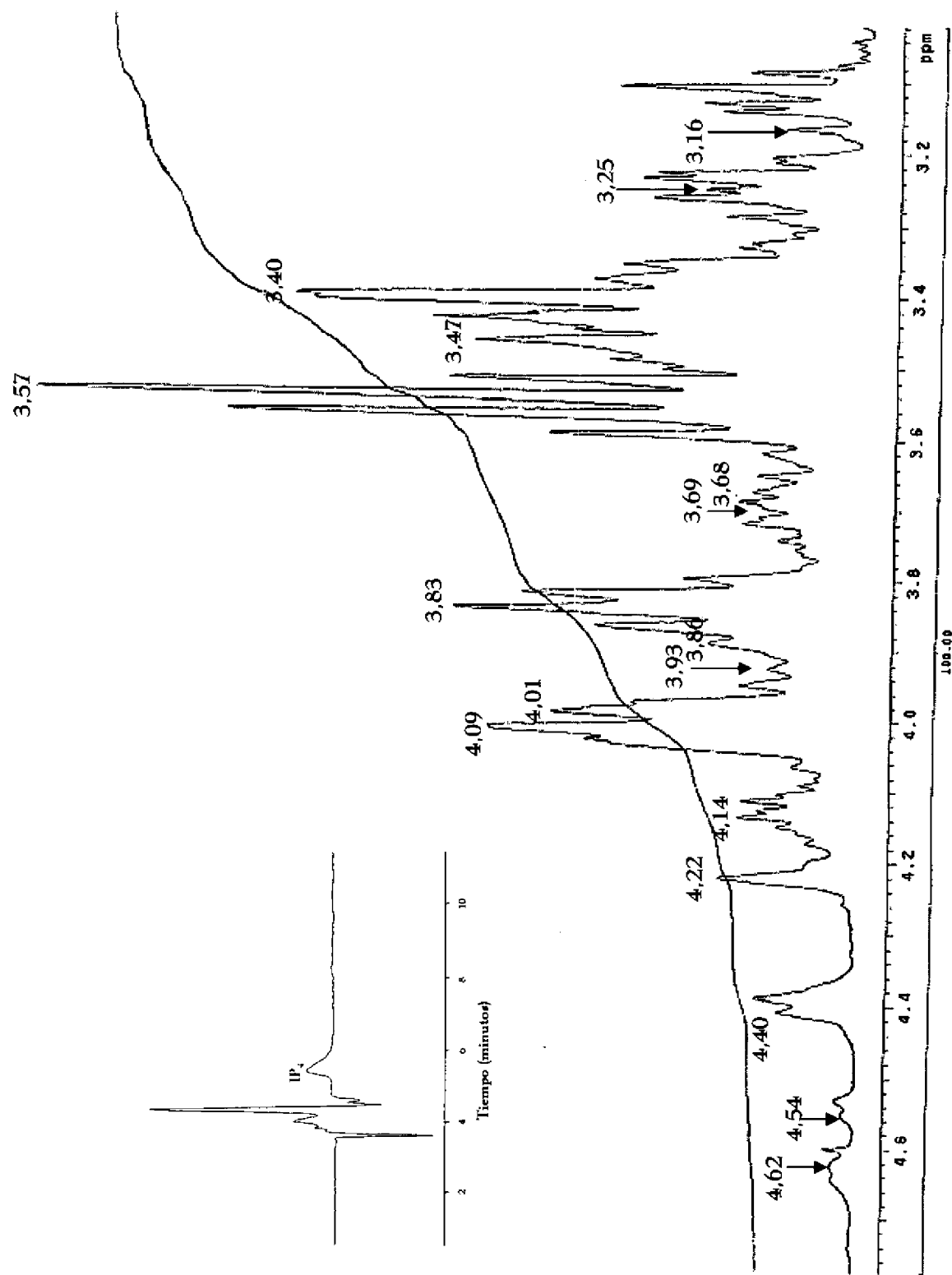


Figura 26. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,15 patrón

La mayor parte de los inositol tetrafosfatos descritos tienen la posición C-2 fosfatada y se les asigna una señal en el entorno 4,7 a 4,9 ppm, por consiguiente, ninguno de esos inositol tetrafosfatos estaba presente en F-0,15. Uno de ellos, Ins(1,3,4,5)P₄ descrito por Cerdan y col. (1986), sí puede estar presente en la muestra de F-0,15 patrón (Tabla 36). Se pudieron identificar la señales de algunos inositol trifosfatos como Ins (1,5,6)P₃ de Philippy (2000) y Ins(1,2,6)P₃ de Nakano y col. (1989).

Teniendo en cuenta la importancia de las bandas entre 3 y 4 ppm, cabe postular que junto a estos inositol trifosfatos se puedan encontrar derivados de inositol difosfato o inositol monofosfato, como los que asignamos en la Tabla 36. Como ya hemos indicado anteriormente, el método de HPLC no permite identificar este tipo de derivados.

Fracción F-0,08 patrón

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,08N. En la Tabla 37 se recogen las señales más significativas del espectro de RMN de ¹H de la fracción F-0,08 patrón (Fig. 27) y algunos de los productos que pudieron estar presentes en ella.

Tabla 37. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,08 patrón con la información bibliográfica

F-08 patrón (ppm) Intensidad relativa	Ins(1,5,6)P ₃ (Philippy, 2000)	Ins(1,4)P ₂ (Cerdan y col.1986)	Ins(2)P ₁ (Tarelli, 2000)	Ins(1) ó Ins (3)P ₁ (Tarelli 2000)
4,65; 17				
4,44; 5	4,40 H-6		4,40 H-2	
4,27; 29	4,23 H-2	4,23 H-2		
4,25; 23				
4,12; 13	4,09 H-1	4,13 H-4		4,15 H-2
4,00; 10	4,01 H-5			
3,93; 69		3,93 H-1		
3,90; 72				
3,87; 34	3,84 H-4	3,83 H-6		3,83 H-1
3,70; 60	3,67 H-3	3,67 H-3		
3,60; 17			3,60; 3,60 H-4; H-6	3,64 H-6
3,55; 25		3,48 H-5		3,54 H-4
3,44; 83			3,41; 3,41 H-1; H-3	3,42 H-3
3,32; 99				
3,29; 119				
3,25; 121				
3,22; 74				3,22 H-5
3,18; 57			3,16 H-5	
3,09; 42				
3,00; 40				
2,97; 55				

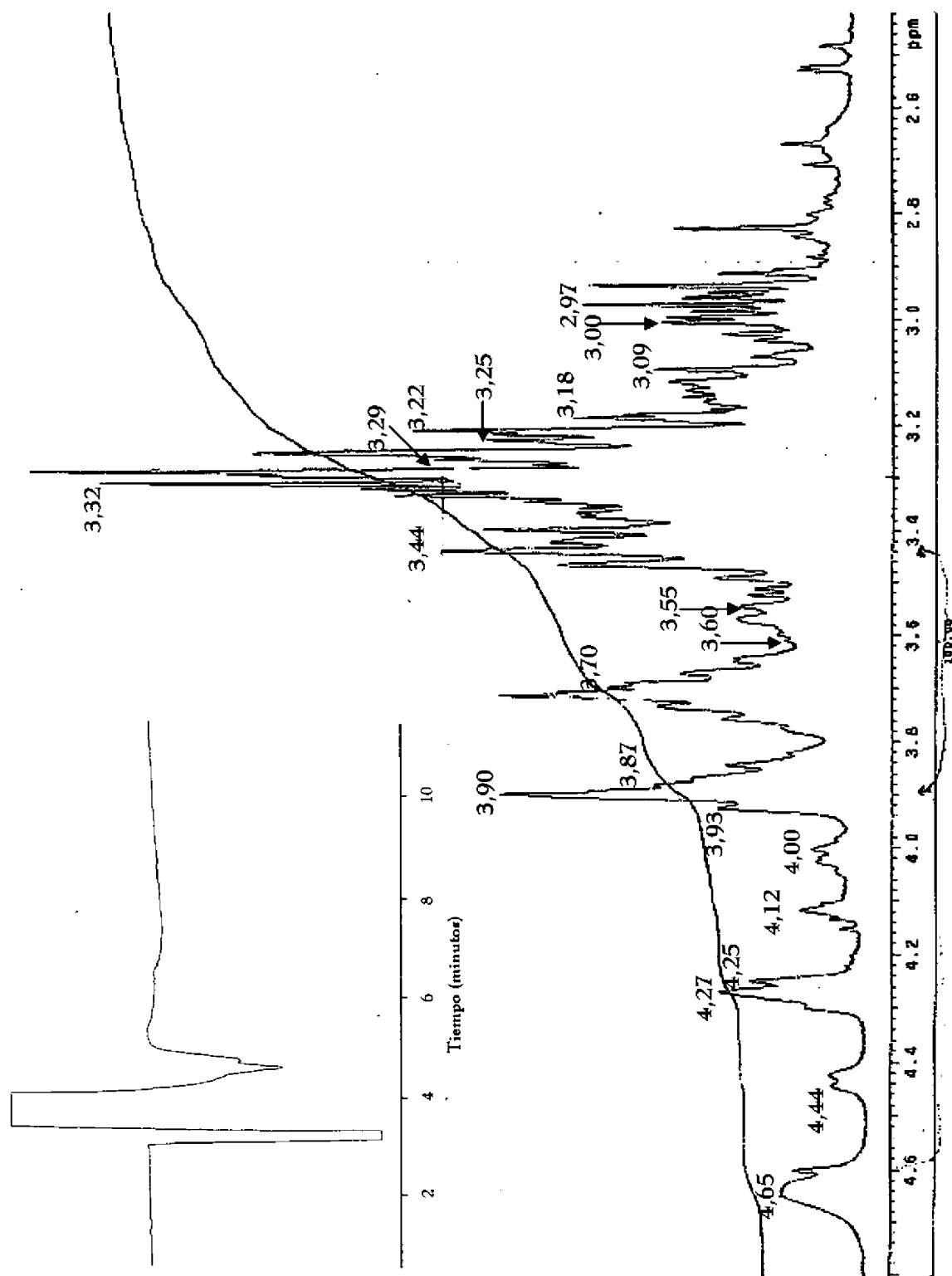


Figura 27. Espectro de RMN ^1H y cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos de la fracción F-0,08 patrón

La señal a 4,65 puede ser un indicio de la presencia de algún otro inositol trifosfato como el Ins(1,2,6)P₃ de Philippy (2000). El análisis de HPLC permitió excluir claramente la presencia de inositol hexa-, inositol penta- o inositol tetrafosfatos de inositol.

En conclusión podemos decir que esta metodología nos permitió aventurar algunas hipótesis bastante fiables acerca de la composición de estas fracciones cromatográficas, que va mas allá de una división en “familias” de inositol pentafofosfatos, inositol tetrafosfatos, etc. Pudimos aventurar estas hipótesis incluso en el caso de aquellas fracciones como F-08 patrón o F-15 patrón, donde la cromatografía sólo nos permitió decir lo que no había. El método mejoraría su validez si se dispusiese de una mayor información sobre espectros de RMN de ¹H de derivados puros. A partir de la hidrólisis de fitato sódico se han identificado por RMN los siguientes patrones:

1 inositol hexafofosfato: InsP₆ ó ácido fítico

2 inositol pentafofosfatos: Ins(1,3,4,5,6)P₅ e Ins(1,2,3,5,6)P₅

3 inositol tetrafosfatos: Ins (1,2,3,4)P₄, Ins(1,2,5,6)P₄ e Ins(1,3,4,5)P₄

2 inositol trifosfatos: Ins(1,2,6)P₃ e Ins(1,5,6)P₃

1 inositol difosfato: Ins (1,4)P₂

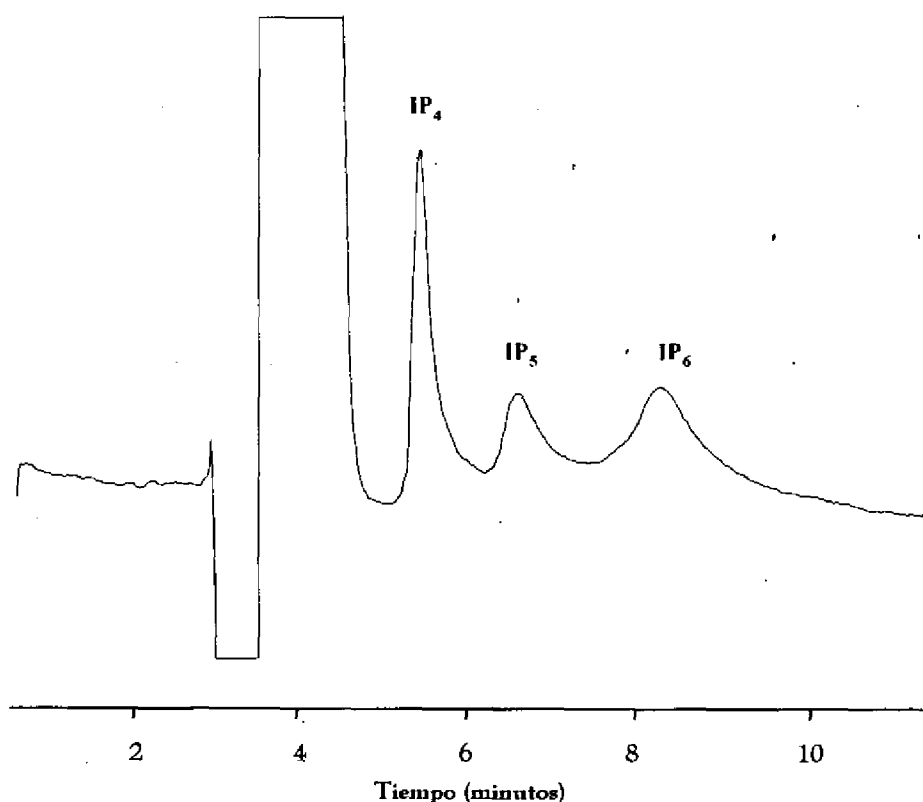
2 inositol monofosfato: Ins (2)P₁ e Ins (1 o 3)P₁

4.3.3.2. Contribución a la determinación de estructuras de inositol fosfatos por RMN ^1H en harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones de fermentación natural.

Sometimos a las alubias FN (10 gramos) a un proceso de extracción de los derivados de fosfato de inositol y, este extracto, a una purificación en columna de resina cambiadora de iones, tal como hicimos con el producto de la hidrólisis ácida del ácido fítico patrón. Después de esta purificación conseguimos una serie de fracciones que analizamos mediante espectroscopia de RMN de ^1H . Los resultados de los análisis los comentamos a continuación.

En la Figura 28 se muestra el cromatograma de HPLC obtenido de los inositol fosfatos presentes en la muestra FN.

Figura 28. Cromatograma de HPLC de los inositol fosfatos obtenidos para la muestra FN



Fracción F-52 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,52N. En la Figura 29 se muestra el espectro obtenido para esta fracción y en la Tabla 38 las asignaciones encontradas.

Tabla 38. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,52 patrón con la fracción F-0,52 FN

F-0,52 patrón (ppm) Intensidad relativa	F-0,52 FN (ppm) Intensidad relativa
4,77; 15	4,78; 25
4,63; 15	4,61; 20
4,35; 75	4,35; 80
4,20; 100	4,20; 100
4,12; 60	4,12; 40

Esta fracción puede contener ácido fítico (señales a 4,78; 4,35 y 4,20 ppm) acompañado del inositol pentafofato (3) con señales a 4,61; 4,35 y 4,20 ppm, tal como hemos comentado para la fracción F-0,52 patrón. Ambos compuestos se encuentran aproximadamente a partes iguales. Tampoco se puede excluir la presencia del Ins (1,2,3,5,6)P₅ descrito por Nakano (1989).

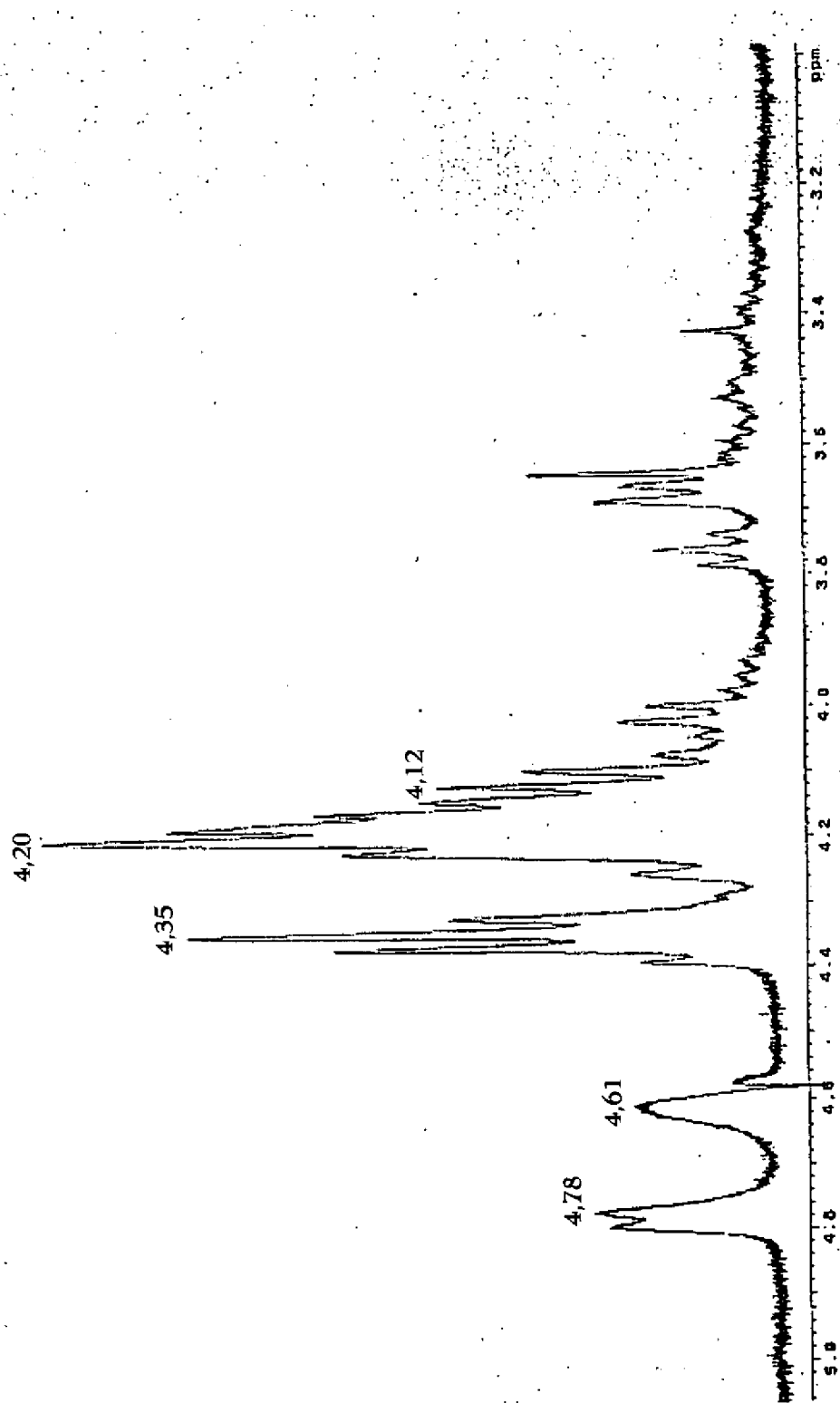


Figura 29. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0,52 FN

Fracción F-0,50 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,50N. Aunque como ya señalamos al principio de este capítulo, el ácido fítico fue el principal componente fosfatado de las semillas y, por tanto, de las semillas de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla), aunque una vez fermentadas se detectó escasa cantidad de ácido fítico y el espectro obtenido en la fracción F-0,50 FN (Fig. 30) fue muy similar al obtenido en la fracción F-0,50 con patrones (Fig. 21). En la Tabla 39 se indican los valores de ambas fracciones.

Tabla 39. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,50 patrón y F-0,50 FN

F-0,50 patrón (ppm); Intensidad relativa	F-0,50 FN (ppm); Intensidad relativa
4,74; 30	4,77; 30
4,64; 11	
4,29; 83	4,33; 109
4,15; 134	4,18; 140
4,13; 126	4,13; 89
4,06; 99	4,08; 63
3,98; 83	4,01; 40
3,74; 80	3,75; 37
3,61; 94	3,67; 52
3,34; 23	

En la harina funcional de judías (FN) podría haber InsP_5 (señales a 4,77, 4,33, 4,18, 4,01 y 3,67 ppm), que pudieran corresponder con el descrito por Nakano y col. (1989), y posiblemente otros InsP_5 cuyo RMN no descrito, pero que mantienen el oxígeno O-2 fosfatado (como p.ej. 2 ó 5). Estos nuevos pentafofosatos que postulamos deben dar señales a campo bajo (3,6 a 3,7 ppm). No se pudo excluir la presencia de InsP_6 (señales a 4,77, 4,33 y 4,18), aunque pareció poco probable dado que ya se había detectado en la fracción anterior y no debe ser muy abundante en este producto. La falta de señales por debajo de 3,67 ppm parece coherente con la ausencia de derivados menos fosfatados, al menos en cantidades significativas.

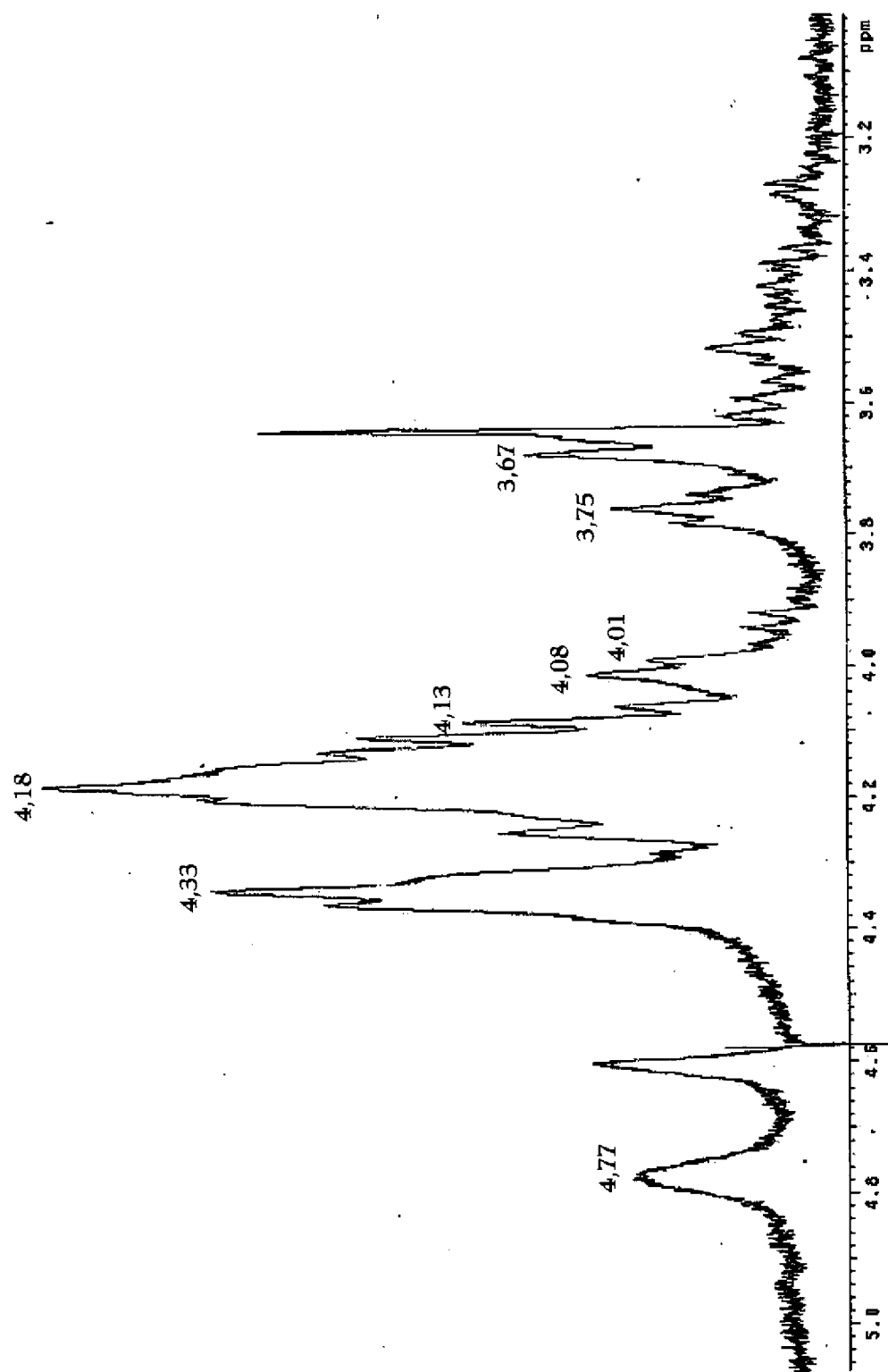


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0.50 FN

Fracción F-0,38 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,38N. El espectro de esta fracción (Fig. 31) reflejó las similitudes existentes con el espectro de F-0,38 patrón (Fig. 23) y también las diferencias que en este caso fueron bastante significativas como explicaremos en la Tabla 40.

Tabla 40. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,38 patrón, F-0,38 FN e información bibliográfica

F-38 patrón (ppm); Intensidad rel.	F-38 FN (ppm); Intensidad rel.	(1,2,6)P ₃ (Phillippy, 2000)	(1,5,6)P ₃ (Phillippy, 2000)	(1,3,4,5)P ₄ (Cerdan y col. 1986)	(1,2,3,5,6)P ₅ (4) (Nakano y col. 1989)
4,72; 25	4,75; 50	4,72 H-2			4,88 (d) H-2
4,65; 20	4,63; 60				
4,46; 8					
	4,38; 13		4,40 H-6	4,38 H-4	
4,30; 75	4,33; 49	4,30 H-6			4,42 (q) H-4
	4,24; 36		4,23 H-2		
4,16; 155	4,16; 89				
4,13; 130	4,13; 73			4,12 H-2	4,27 (t) H-3
	4,10; 68	4,11 H-1	4,09 H-1	4,08 H-3	
4,06; 110	4,06; 52				
4,03; 120	4,03; 40				
4,01; 148	4,01; 50		4,01 H-5	4,01 H-5	
3,98; 100	3,99; 44			4,00 H-1	4,11 (q) H-1; H-5
3,91; 110	3,90; 21			3,90 H-6	
	3,88; 19		3,84 H-4		
	3,78; 23	3,81 H-4			
3,71; 75	3,76; 32				
3,61; 135	3,65; 35		3,67 H-3		3,75 (t) H-6
3,51; 85	3,51; 35	3,52 H-3; 3,52 H-5			
3,36; 30					

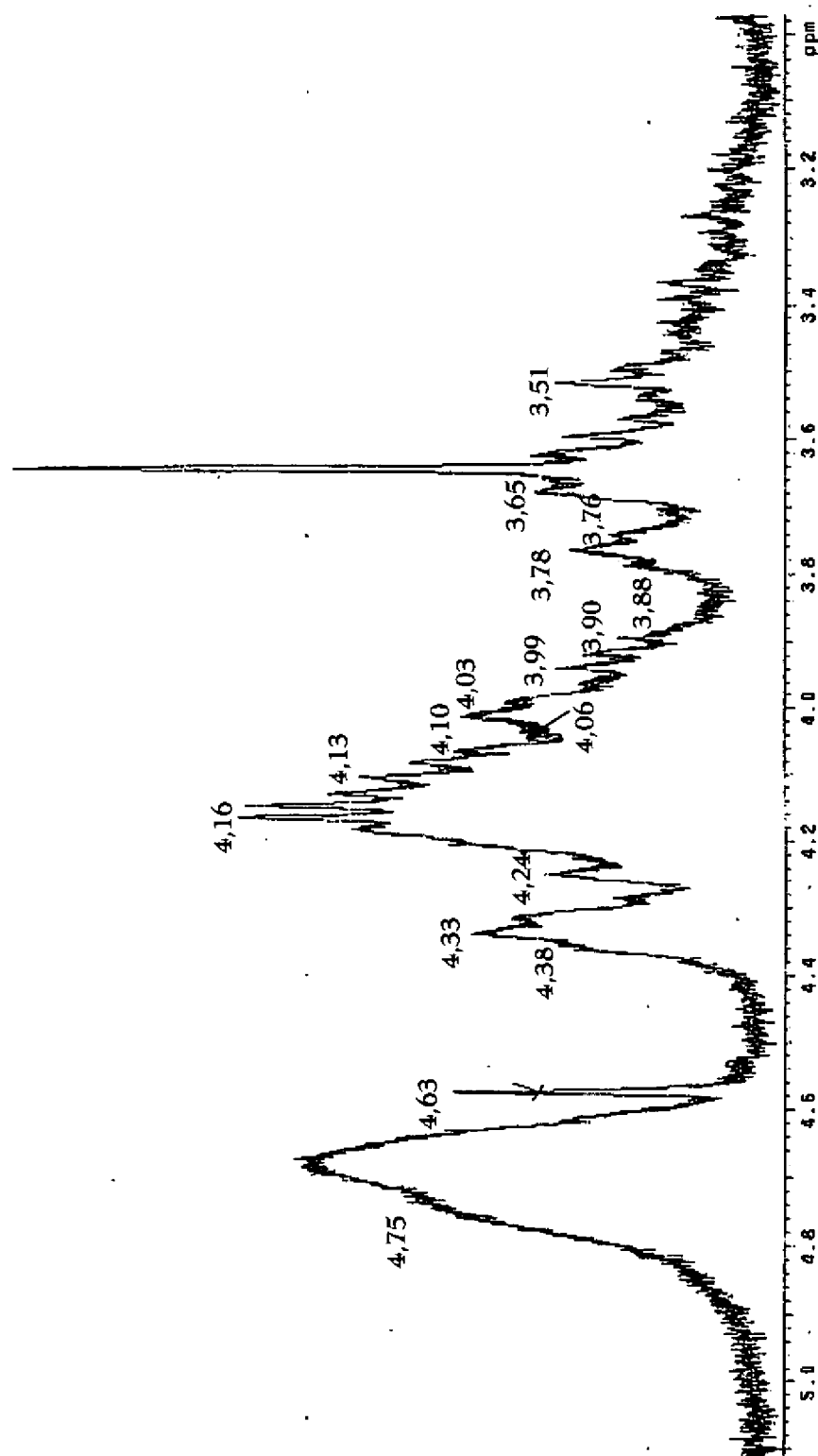


Figura 31. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0,38 FN

Tal como se aprecia en la Fig. 31 (comparando con la Fig. 23), el espectro de RMN de ^1H de F-0,38 FN tuvo señales más fuertes (en términos relativos) en la zona de 4,7 a 4,6 ppm.

Se apreciaron claramente las señales del inositol tetrafosfato $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ descrito por Cerdan y col. (1986), que es un componente natural de estas semillas y que junto con el $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ de Nakano y col. (1989) y posiblemente el $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ que venimos postulando como responsable de la señal a 4,60 ppm, darían cuenta de la mayor parte de las señales observadas en este espectro. Asignamos también señales a dos inositol trifosfatos descritos por Phillippy: el $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ y el $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$.

Fracción F-0,32 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,32N. El espectro de esta fracción fue relativamente débil (Fig. 32), pero aún así, fue posible compararlo con los resultados de la fracción anterior (F-0,38 FN), con los que guarda ciertas semejanzas (Tabla 39).

Tabla 41. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,32 FN con F-0,38 FN e información bibliográfica

F-0,38 FN (ppm); Intensidad rel.	F-0,32 FN (ppm); Intensidad rel.	Ins(1,4,5) P ₃ (Cerdan y col. 1986)	Ins(1,2,6) P ₃ (Phillippy 2000)	Ins(1,3,4,5) P ₄ (Cerdan y col. 1986)	(1,2,3,4,5) P ₅ (4) (Nakano y col. 2000)
4,75; 50	4,75; 10		4,72 H-2		4,88 (d) H-2
4,63; 60	4,60; 33				
4,38; 13					
4,33; 49	4,34; 19	4,30 H-2	4,30 H-6	4,38 H-4	4,42 (q) H-4
4,24; 36	4,19; 36				
4,16; 89	4,17; 36	4,21 H-4			
4,13; 73	4,14; 29			4,12 H-2	4,27 (t) H-3
4,10; 68	4,10; 29			4,08 H-3	
4,06; 52	4,06; 24		4,11 H-1		
4,03; 40	4,04; 20				
4,01; 50	4,01; 30			4,01 H-5	
3,99; 44	3,99; 26	3,95 H-1		4,00 H-1	4,11 (q) H-1;
	3,95; 22	3,94 H-5			
3,90; 21	3,91; 23	3,93 H-6		3,90 H-6	
3,88; 19	3,84; 10		3,81 H-4		
3,78; 23					
3,76; 32	3,76; 20	3,73 H-3			
3,65; 35	3,65; 15				3,75 (t) H-6
	3,59; 32				
3,51; 35	3,52; 21		3,52 H-3; 3,52 H-5		
	3,42; 19				
	3,36; 19				

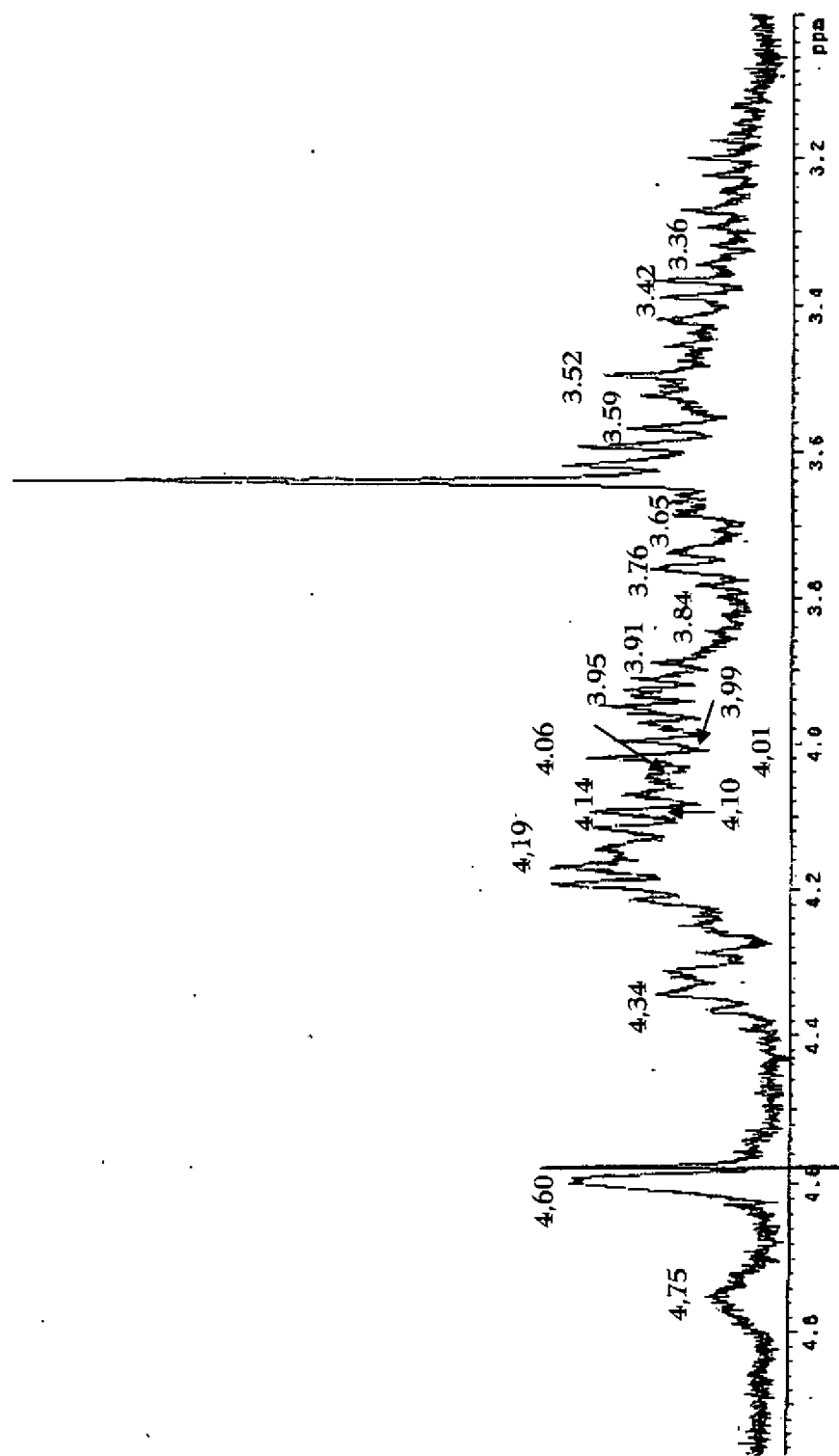


Figura 32. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0,32 FN

La conclusión a la que se pudo llegar fue que en la fracción F-0,32 FN debían de estar presentes algunos de los compuestos que señalamos para la fracción F-38 FN, tales como el inositol trifosfato $\text{Ins}(1,2,6)\text{P}_3$ de Phillippy (2000), el inositol tetrafosfato $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ de Cerdan y col. (1986) ó el inositol pentafosfato $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ (4) de Nakano y col. (1989). La intensa señal (siempre en términos relativos) que se observó a 4,60 ppm en el espectro de RMN de ^1H de F-32 FN sugirió la posible presencia de al menos otro inositol pentafosfato, el $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ (3) que vinimos postulando como responsable de esa señal. En esta muestra también fue posible asignar el inositol trifosfato $(1,4,5)\text{P}_3$ de Cerdan y col. (1986) tal como se indica en la Tabla 41. Como ya hemos señalado anteriormente, este inositol trifosfato tiene una especial significancia biológica por su intervención en el sistema de señalización celular (Raboy, 2003).

Fracción F-0,28 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,28N. En la Tabla 42 se observan las señales obtenidas y en la Figura 33 se muestra el espectro de RMN de esta fracción.

Tabla 42. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,28 FN con F-0,32 FN e información bibliográfica

F-0,32 FN (ppm) Intensidad rel.	F-0,28 FN (ppm) Intensidad rel.	Ins(1,2,6)P ₃ (Phillippy 2000)	Ins (1,4,5)P ₃ (Cerdan y col. 1986)	Ins(1,3,4,5)P ₄ (Cerdan y col. 1986)
4,75; 10	4,75; 5	4,72 H-2		
4,60; 33	4,63; 16			
		4,30 H-6	4,30 H-2	
			4,21 H-4	
4,34; 19	4,31; 15	4,11 H-1		4,38 H-4
4,19; 36				
4,17; 36	4,17; 33			4,12 H-2
4,14; 29	4,15; 32			4,08 H-3
4,10; 29				
4,06; 24	4,07; 29		3,95 H-1	
4,04; 20			3,94 H-5	
			3,93 H-6	4,01 H-5
4,01; 30		3,81 H-4		4,00 H-1
3,99; 26	3,99; 22		3,73 H-3	
3,95; 22	3,95; 30			3,90 H-6
3,91; 23	3,90; 26			
3,84; 10	3,84; 30			
3,76; 20	3,76; 20			
	3,68; 29			
3,65; 15	3,64; 143			
3,59; 32	3,60; 31			
3,52; 21	3,51; 28	3,52 H-3; 3,52 H-5		
3,42; 19	3,43; 21			
3,36; 19	3,40; 19			

Tal como recogemos en la Tabla 42, en la interpretación del espectro de la fracción F-0,32 FN podemos asignar el espectro del Ins(1,4,5)P₃ de Cerdan y col. (1986) y el espectro del Ins(1,2,6) de Phillipy (2000). Así se puede concluir que la fracción F-0,28 FN fue muy similar a la F-0,32 FN en su composición.

Fracción F-0,15 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,15N. Recogemos en la Tabla 43 un listado de los picos observados en el RMN de ¹H de esta fracción (Fig. 34).

Tabla 43. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,15 FN con F-0,28 FN e información bibliográfica

F-28 FN (ppm) Intensidad rel.	F-15 FN (ppm) Intensidad rel.	Ins(1,4)P ₂ (Cerdan y col. 1986)	Ins(1)P ₁ ó Ins (3)P ₁ (Tarelli 2000)
4,75; 5			
4,63; 16	4,64; 34		
4,31; 15			
	4,24; 12	4,23 H-2	
4,17; 33	4,17; 19		
4,15; 32	4,15; 18	4,13 H-4	4,15 H-2
4,07; 29			
3,99; 22			
3,95; 30	3,93; 8	3,93 H-1	
3,90; 26			
3,84; 30	3,82; 26	3,83 H-6	3,83 H-1
	3,80; 27		
3,76; 20	3,78; 22		
3,68; 29	3,68; 20	3,67 H-3	3,64 H-6
3,64; 143			
3,60; 31	3,60; 38		
	3,57; 53		
	3,56; 38		3,54 H-4
3,51; 28	3,50; 26		
	3,47; 45	3,48 H-5	
3,43; 21	3,42; 20		3,42 H-3
3,40; 19	3,39; 44		
	3,20; 14		3,22 H-5
	3,15; 26		

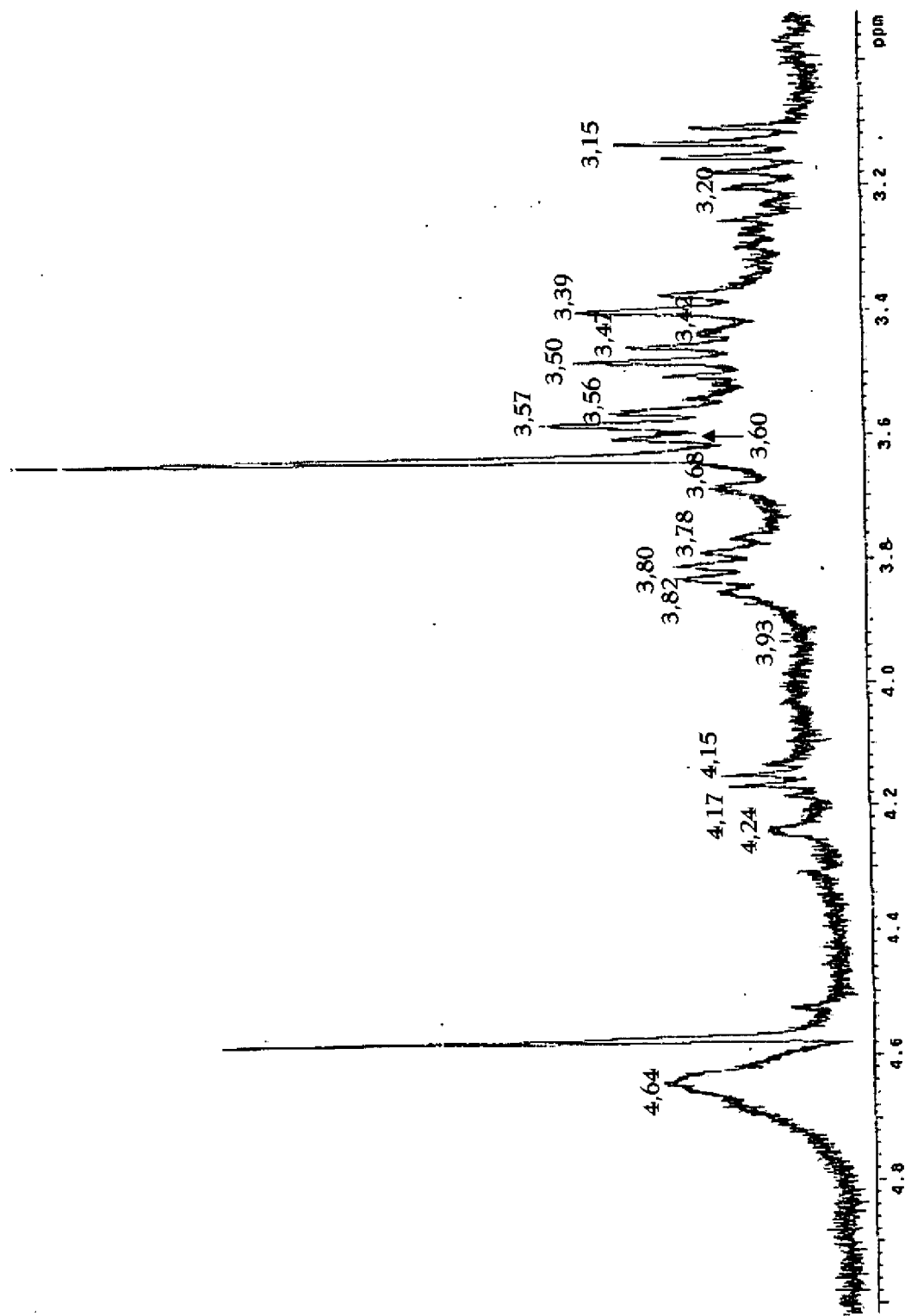


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0,15 FN

Aunque lógicamente existían coincidencias con las señales del espectro de la fracción F-28 FN (Tabla 42), sin embargo, no fue posible asignar las señales de los compuestos que identificamos en esa fracción. Las señales de este espectro debían de corresponder a inositol mono- ó inositol difosfatos, predominantemente. De hecho, en la Tabla 42, identificamos señales correspondientes al $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ descrito por Cerdan y col. (1986) y el $\text{Ins}(1)\text{P}_1$ ó $\text{Ins}(3)\text{P}_1$ descritos por Tarelli (2000). Tenemos que señalar aquí, que la información existente sobre espectros de RMN de ^1H de derivados fosfatados de inositol no solo es escasa, sino que en ocasiones, como es el caso del $\text{Ins}(1)\text{P}_1$ ó $\text{Ins}(3)\text{P}_1$ descritos por Tarelli (2000), no coincide con los datos publicados por Cerdan y col. (1986) para la misma sustancia. Nosotros hemos tomado los datos de Tarelli por ser esta una publicación más reciente. Ocurre lo mismo con el $\text{Ins}(2)\text{P}_1$ descrito por ambos grupos y para los que nosotros también hemos coincidido con los datos de Tarelli (2000).

Fracción F-0,08 FN

Esta fracción fue la que se eluyó de la columna de resina Dowex con ácido clorhídrico 0,08N. El espectro de RMN de ^1H de esta fracción (Fig. 35), fue bastante diferente al que se obtuvo para la fracción F-0,08 patrón, aunque tuvo, sin embargo, algunas coincidencias con el espectro de la fracción F-0,15 FN que comentamos más arriba (Fig. 34, Tabla 43).

Tabla 44. Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,08 FN con F-0,15 FN e información bibliográfica.

F-0,15 FN (ppm) Intensidad rel.	F-08 FN (ppm); Intensidad rel.	Ins(4) ó Ins(6)P ₁ (Tarelli 2000)	Ins(1)P ₁ ó Ins(3)P ₁ (Tarelli 2000)	Ins(1,4)P ₂ Cerdan y col. 1986)
4,64; 34	4,60; 13			
4,24; 12	4,20; 25			4,23 H-2
4,17; 19	4,18; 38		4,15 H-2	
4,15; 18	4,12; 24			4,13 H-4
	4,10; 36			
	4,09; 36			
	4,02; 18	4,02 H-4		
3,93; 8	3,93; 69	3,95 H-2		3,93 H-1
	3,92; 69			
	3,90; 43			
	3,88; 33			
	3,86; 34			
3,82; 26				
3,80; 27	3,80; 20		3,83 H-1	3,83 H-6
3,78; 22	3,75; 21			
3,68; 20	3,65; 25		3,64 H-6	3,67 H-3

Tabla 44 (cont). Comparación de las asignaciones de RMN de la fracción F-0,08 FN con F-0,15 FN e información bibliográfica

F-0,15 FN (ppm) Intensidad rel.	F-08 FN (ppm); Intensidad rel.	Ins(4) δ Ins(6)P ₁ (Tarelli 2000)	Ins(1)P ₁ δ Ins(3)P ₁ (Tarelli 2000)	Ins(1,4)P ₂ Cerdan y col. 1986)
3,60; 38	.			
3,57; 53	3,57; 31	3,59 H-3;	3,54 H-4	
3,56; 38				
3,50; 26				
3,47; 45	3,45; 26	3,45 H-1	3,42 H-3	3,48 H-5
3,42; 20				
3,39; 44	3,39; 43			
	3,37; 84			
	3,35; 84			
	3,34; 43	3,32 H-5		
	3,29; 28			
	3,26; 18			
	3,23; 20		3,22 H-5	
3,20; 14				
3,15; 26	3,15; 16			

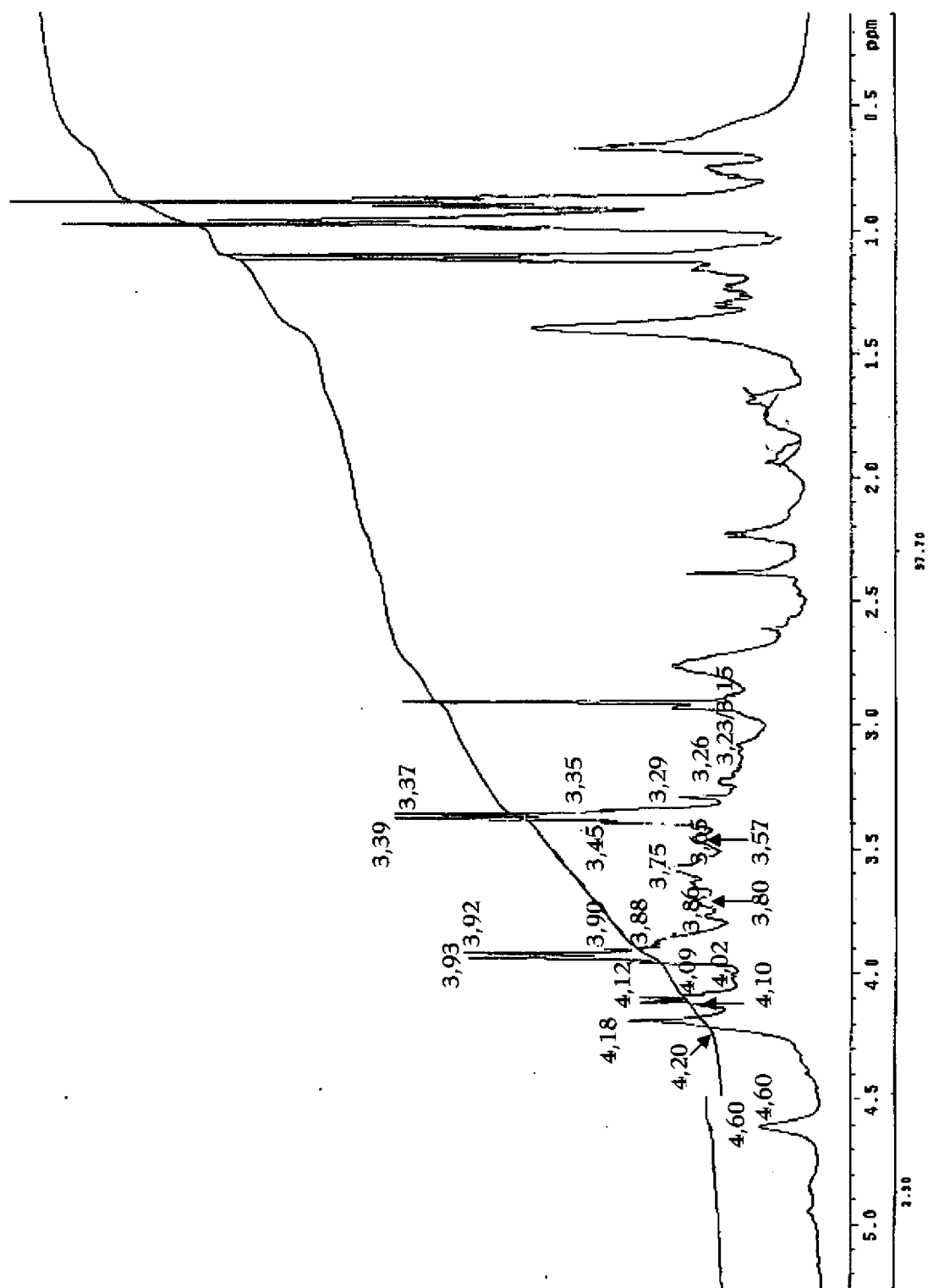


Figura 35. Espectro de RMN ^1H de los inositol fosfatos de la fracción F-0.08 FN

Como se puede apreciar con los datos recogidos en la Tabla 44, fue posible asignar las señales de algunos de los compuestos que ya identificamos en el espectro de F-0,15 FN, tales como Ins(1)P₁ ó Ins(3)P₁ de Tarelli (2000) y el Ins(1,4)P₂ de Cerdan y col. (1986), además de algún nuevo inositol monofosfato como el Ins(4) ó Ins(6)P₁ descrito por Tarelli (2000).

En conclusión, podemos decir que la espectroscopía de RMN nos permitió profundizar en la composición del contenido de inositol fosfatos de las harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) obtenidas en condiciones óptimas de fermentación natural. Se han asignado los siguientes inositol fosfatos:

1 inositol hexafosfato: InsP₆ ó ácido fítico

2 inositol pentafosfatos: Ins(1,3,4,5,6)P₅ e Ins(1,2,3,5,6)P₅

1 inositol tetrafosfato: Ins(1,3,4,5)P₄

2 inositol trifosfatos: Ins(1,2,6)P₃ e Ins(1,4,5)P₃

1 inositol difosfato: Ins (1,4)P₂

3 inositol monofosfatos: Ins (2)P₁, Ins (1 ó 3)P₁, Ins (2)P₁ e Ins (2)P₁

Es interesante resaltar la constatación de la presencia de isómeros concretos como el Ins(1,4,5)P₃, involucrado en la señalización celular, así como la de inositol monofosfatos y difosfatos, que no han podido detectarse por el procedimiento de HPLC que utilizamos durante el análisis.

4.3.4. Valoración de la capacidad antioxidante de las harinas funcionales de judías obtenidas en óptimas condiciones

En las harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) obtenidas, se han llevado a cabo distintas determinaciones de capacidad antioxidante, con el fin de ofrecer una visión más amplia de los factores que intervienen en el mecanismo oxidativo. Para ello se ha evaluado el efecto de la fermentación en los siguientes parámetros:

- ♦ Enzimas antioxidantes: Glutation (GSH) y actividad superóxido dismutasa (SOD)
- ♦ Capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC)
- ♦ Capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica *in vitro*
- ♦ Capacidad antioxidante total (TEAC)

En las Tablas 45-47 se recogen los valores sobre capacidad antioxidante de *Vigna sinensis* var. Carilla. En las judías crudas el contenido en GSH (glutation reducido) y glutacion oxidado (GSSG) es de 3,25 $\mu\text{mol/g s.s}$ y 0,6 $\mu\text{mol/g s.s.}$, respectivamente, la actividad SOD es 4,6 U SOD/mg proteína, la capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC) en los extractos de PBS y metanol de judías crudas es 8,7 $\mu\text{moles trolox /g s.s.}$ y 6,63 $\mu\text{moles trolox /g s.s.}$, respectivamente. La capacidad antioxidante observada para inhibir la peroxidación de PC, expresado como porcentaje de inhibición es del 48% (inhibición a 2 h). Las judías crudas presentan un TEAC en PBS, en metanol y en diclorometano de 27,39 $\mu\text{mol trolox/g s.s.}$, 0,57 $\mu\text{mol trolox/g s.s.}$ y 12,73 $\mu\text{mol trolox/g s.s.}$, respectivamente.

Efecto de la fermentación sobre las enzimas antioxidantes de judías.

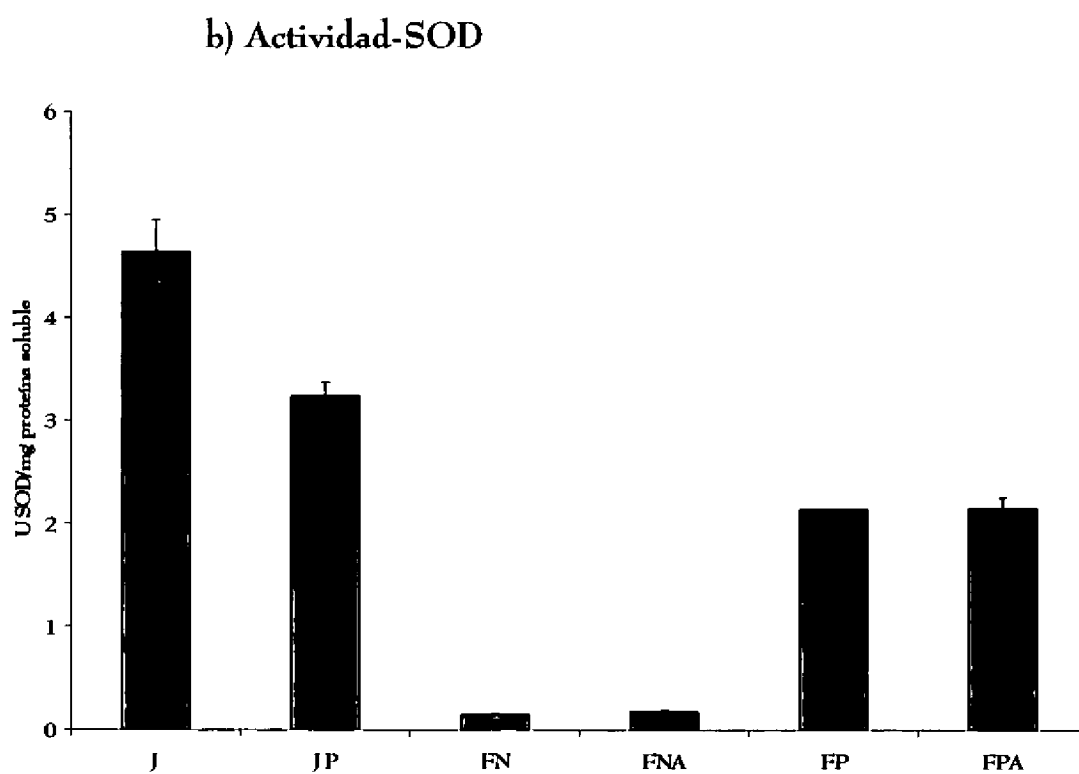
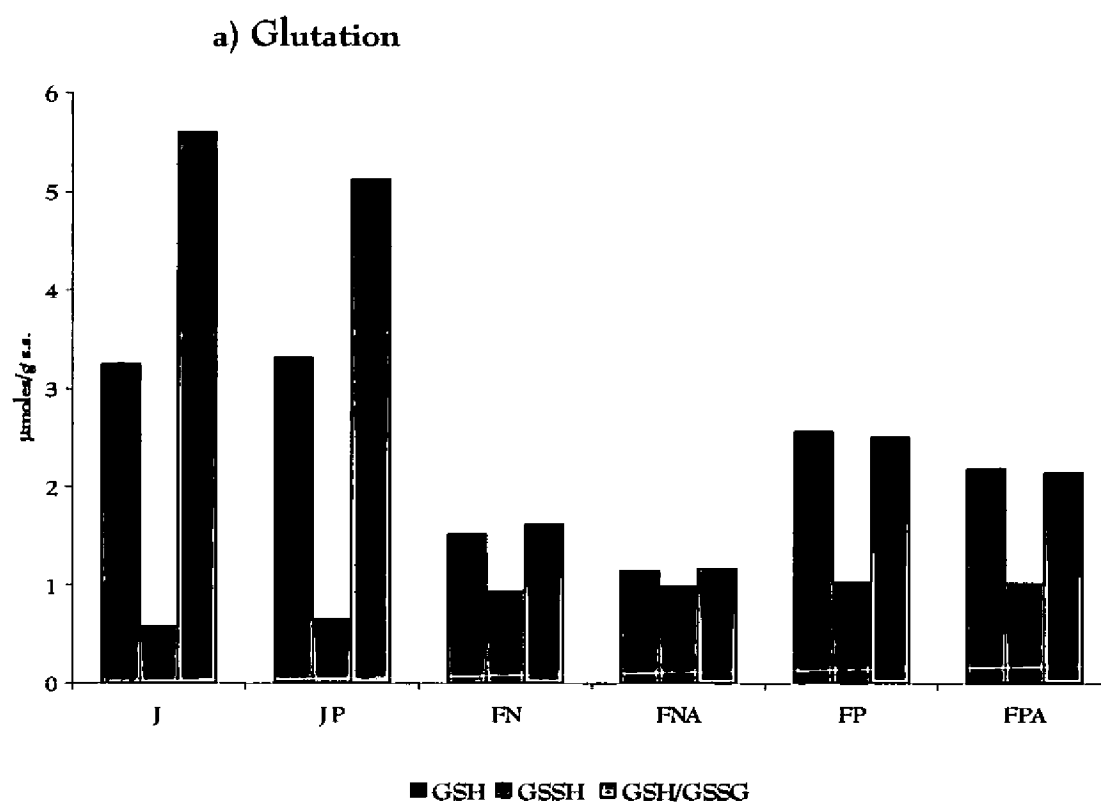
En la Tabla 45 y Gráfico 7, se recogen los valores obtenidos sobre el contenido en glutathion reducido (GSH), glutathion oxidado (GSSG) (expresados en $\mu\text{mol/g s.s.}$), la relación GSH/GSSH y actividad de la enzima superóxido dismutasa de las harinas funcionales de judías obtenidas.

Tabla 45. Efecto de la fermentación de judías y calentamiento con autoclave sobre las enzimas antioxidantes *

<i>Vigna sinensis</i> var. Carilla	Glutation			Actividad SOD
	GSH ($\mu\text{mol/g s.s.}$)	GSSG ($\mu\text{mol/g s.s.}$)	GSH/GSSG	U SOD/ mg proteína
J	$3,25 \pm 0,01^c$	$0,58 \pm 0,03^a$	$5,61 \pm 0,26^d$	$4,64 \pm 0,31^c$
JP	$3,32 \pm 0,06^c$	$0,65 \pm 0,03^a$	$5,13 \pm 0,37^c$	$3,24 \pm 0,13^b$
FN	$1,52 \pm 0,07^b$	$0,94 \pm 0,01^b$	$1,62 \pm 0,09^a$	$0,15 \pm 0,01^a$
FNA	$1,15 \pm 0,05^a$	$0,99 \pm 0,07^b$	$1,17 \pm 0,09^a$	$0,18 \pm 0,01^a$
FP	$2,57 \pm 0,01^d$	$1,03 \pm 0,02^b$	$2,51 \pm 0,06^b$	$2,14 \pm 0,00^b$
FPA	$2,19 \pm 0,03^c$	$1,02 \pm 0,02^b$	$2,15 \pm 0,02^b$	$2,15 \pm 0,10^b$

*) Valores medios \pm desviación estándar de 3 determinaciones. Idéntico superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Gráfico 7: Efecto de la fermentación de judías y calentamiento con autoclave sobre las enzimas antioxidantes.



En las harinas funcionales de judías fermentadas obtenidas se observó un notable descenso en el contenido en GSH, siendo más acusado en FN (53%) que en FP (21%). El posterior tratamiento en autoclave de las harinas fermentadas causó un descenso aún mayor en GSH (65% para FNA y 33% para FPA) (Tabla 45, Gráfico 7). En las harinas funcionales de judías se duplicó el contenido en GSSG, independientemente del tipo de fermentación utilizada, y el posterior tratamiento en autoclave no afectó al GSSG de las harinas de judías procesadas (Tabla 45, Gráfico 7).

Se realizó el cociente entre GSH/GSSH, relación que indica el grado de estrés oxidativo de la muestra, y se observó que dicho cociente disminuyó con la fermentación, siendo más acusada esta disminución en FN, y no se observó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) como consecuencia de la aplicación de autoclave. El hecho que el cociente GSH/GSSH disminuya con la fermentación se debe principalmente al incremento del glutathion oxidado en relación con el glutathion reducido, lo que podría indicar que durante estos procesos se ha producido un incremento del estrés oxidativo. El GSH forma parte de un sistema de defensa primario, cuya función es inactivar los radicales libres antes de iniciarse las reacciones de peroxidación (Cadenas y Packer, 2002). Por ello, esta molécula se oxidaría antes que cualquier otro compuesto antioxidante presente en la muestra.

Durante la preparación de las harinas para el proceso de fermentación (JP) se produjo un descenso del 30% de la actividad SOD. Las harinas funcionales de judías fermentadas presentaron una menor actividad SOD que las semillas crudas (46% PF y 3% FN), y el tratamiento en autoclave no afectó a la actividad SOD de las judías fermentadas.

El descenso en la actividad SOD como consecuencia de la fermentación de judías puede ser debido al incremento del estrés oxidativo producido durante este proceso. La SOD, al igual que el GSH, forma parte de un sistema de defensa primario cuya función es inactivar los radicales libres antes de iniciarse las reacciones de peroxidación (Cadenas y Packer, 2000). La SOD mediante un mecanismo de dismutación, transforma el anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, posteriormente, este peróxido es eliminado por la glutathion peroxidasa mediante la oxidación del glutathion. De ahí que se haya encontrado en las muestras objeto de estudio una correlación positiva ($r = 0,94$) entre GSH y SOD, que indicaría que a medida que la SOD reacciona con el anión superóxido y genera peróxido de hidrógeno, el GSH lo va captando oxidándose a GSSG. Del mismo modo que en el caso del glutathion, esta enzima secuestraría radicales antes que cualquier otro compuesto con carácter antioxidante presente en las muestras.

Efecto de la fermentación de judías en la capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC)

En la Tabla 46 y Gráfico 8, se recogen los datos obtenidos sobre la capacidad para atrapar radicales peroxilo (expresados como $\mu\text{moles trolox/g s.s.}$) de las harinas funcionales de judías obtenidas.

Los datos de la Tabla 46 son valores medios \pm desviación estándar de 3 determinaciones. Idéntico superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$). Idéntico subíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

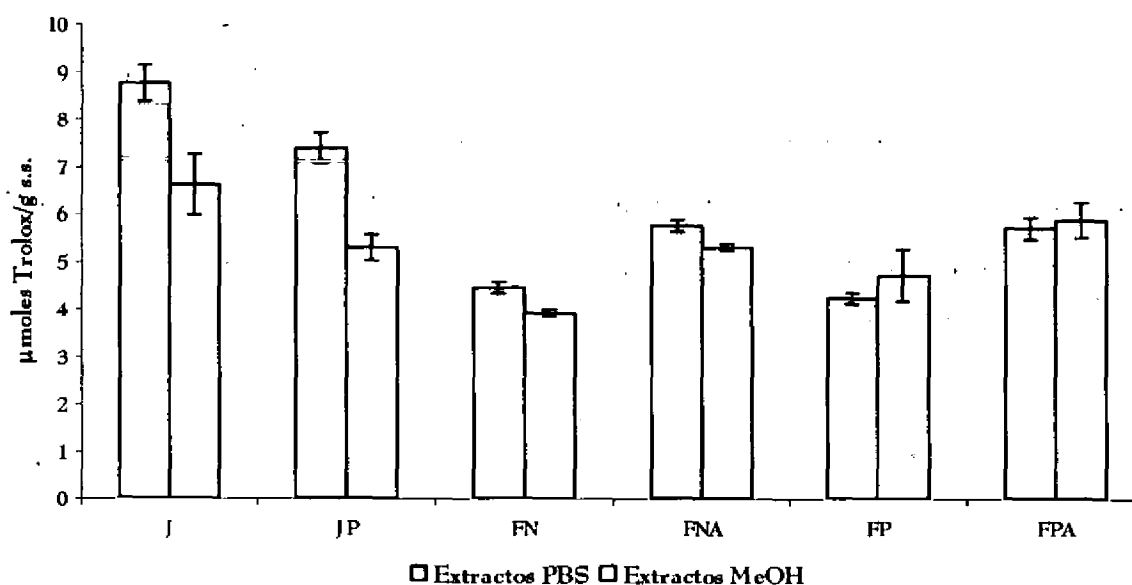
Las abreviaturas utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ PBS = Tampón fosfato salino pH 7,4
- ♦ MeOH = Metanol
- ♦ DCM = Diclorometano

Tabla 46. Efecto de la fermentación de judías *Vigna sinensis* var. Carilla en la capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC)

<i>Vigna sinensis</i> var. Carilla	CAPACIDAD PARA ATRAPAR RADICALES PEROXILO (μ moles trolox/g s.s.)	
	PBS	MeOH
J	$8,77 \pm 0,38_2^d$	$6,63 \pm 0,64_1^d$
JP	$7,40 \pm 0,32_2^c$	$5,31 \pm 0,28_1^{bc}$
FN	$4,46 \pm 0,12_2^a$	$3,93 \pm 0,07_1^a$
FNA	$5,77 \pm 0,50_1^b$	$5,31 \pm 0,84_1^{bc}$
FP	$4,24 \pm 0,11_1^a$	$4,72 \pm 0,55_1^{ab}$
FPA	$5,72 \pm 0,23_1^b$	$5,89 \pm 0,37_1^{cd}$

Gráfico 8: Efecto de la fermentación de judías y calentamiento en autoclave sobre la capacidad de atrapar radicales peroxilo



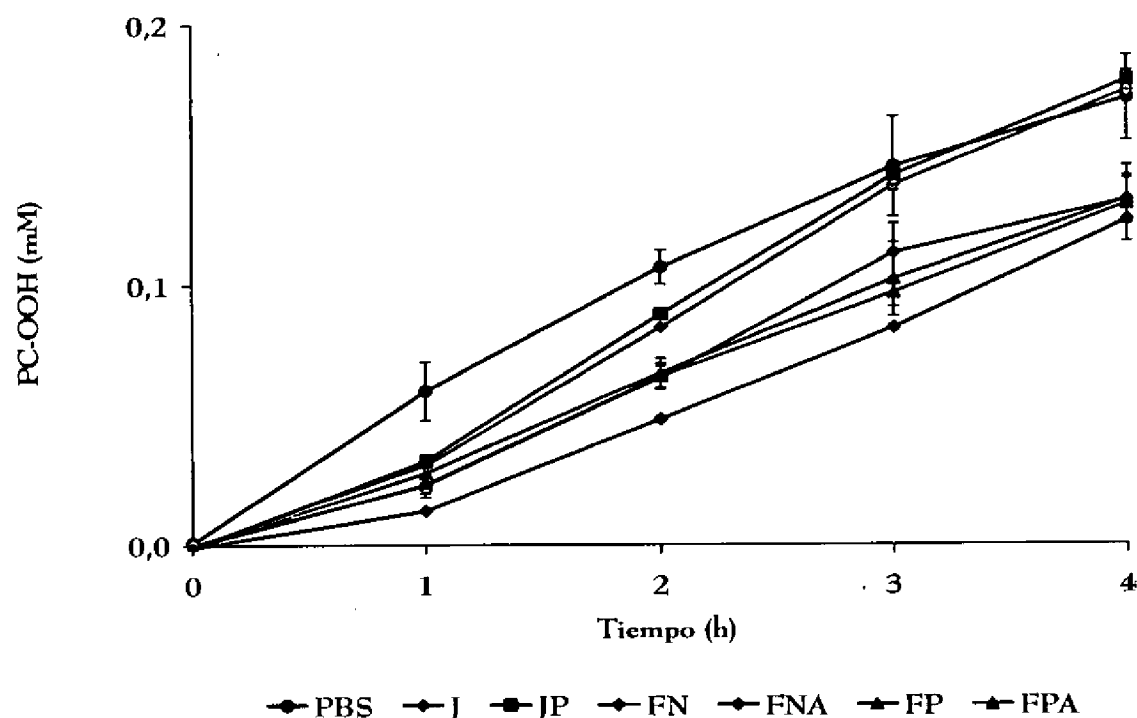
Para determinar la capacidad para atrapar radicales peroxilo (PRTC) de las muestras de judía crudas y procesadas, se obtuvieron extractos con dos disolventes diferentes: PBS y metanol. En general, los resultados sobre la capacidad para atrapar radicales peroxilo fue superior en los extractos en PBS que en los extractos metanólicos, con la excepción de FP y su correspondiente tratamiento en autoclave, donde no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ambos extractos (Tabla 46).

Durante la preparación de las judías para el proceso de fermentación (JP) se produjo una reducción del 16% de PRTC. El proceso de fermentación dio lugar un descenso del PRTC en FP y FN (52 y 49%, respectivamente) y el posterior tratamiento en autoclave produjo un incremento del PRTC de las judías fermentadas. En el caso de los extractos metanólicos, los descensos obtenidos como consecuencia de la fermentación fueron inferiores que los observados con los extractos de PBS (29% para FP y 41% para FN) y el tratamiento en autoclave ocasionó un aumento en PRTC (Tabla 46, Gráfico 8).

Efecto en la capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica de PC in vitro

En el Gráfico 9 se representa la capacidad antioxidante de extractos en PBS de las harinas funcionales de judías, medida mediante la evolución de la inhibición de la peroxidación lipídica en vesículas unilaminares formadas a partir de fosfatidilcolina (PC) de yema de huevo.

Gráfico 9: Efecto de la fermentación de judías y calentamiento en autoclave sobre la inhibición de la peroxidación iniciada por AAPH en liposomas de PC.



Como se muestra en el Gráfico 9, no se observaron diferencias en la evolución de la peroxidación de PC en extractos de PBS de judía cruda (J) y JP durante un periodo de incubación de 4 h. Las harinas funcionales de judías fermentadas obtenidas presentaron una mayor inhibición de la peroxidación de PC que las judías crudas, durante un periodo de incubación de 4 h. El tratamiento en autoclave produjo un incremento en esta inhibición tanto en FP como en FN, respecto a la judía cruda, siendo más acusado en el caso de la fermentación natural (Gráfico 9).

Se calcularon los porcentajes de inhibición de acuerdo con Azuma y col. (1999) a las 2 horas de incubación, tiempo a partir del cual la velocidad de formación de los peróxidos de fosfatidilcolina (PCOOH) de los extractos de las muestras de judías crudas y procesadas, fue la misma a la obtenida en el blanco de

PBS (Gráfico 9). En la Tabla 47 se muestran los valores obtenidos para la actividad antioxidante, expresados como % inhibición de la peroxidación de PC a un tiempo de incubación de 2 horas.

Tabla 47. Efecto de la fermentación de judías y calentamiento en autoclave sobre la inhibición de la peroxidación “*in vitro*”

<i>Vigna sinensis</i> var. Carilla	Actividad antioxidante (%Inhibición)
J	48 ± 2 ^a
JP	46 ± 2 ^a
FN	61 ± 9 ^{bc}
FNA	78 ± 8 ^d
FP	53 ± 11 ^{ab}
FPA	61 ± 1 ^b

* Valores medios ± desviación estándar de 2 determinaciones. Idéntico superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$). % inhibición = $\frac{([PCOOH]_{PBS} - [PCOOH]_{MUESTRA})}{[PCOOH]_{PBS}} \times 100$, a 2 horas de incubación.

Durante la preparación de las harinas para el proceso de fermentación (JP) no se observaron cambios significativos ($P \leq 0,05$) en la inhibición de la peroxidación de PC. Las harinas funcionales de judías fermentadas presentaron un incremento del porcentaje de inhibición de la peroxidación de PC, con valores de inhibición de 53% (FP) y 61% (FN), siendo solo significativo ($P \leq 0,05$) en el caso de fermentación natural. El tratamiento en autoclave produjo un incremento aún mayor en esta actividad antioxidante y los niveles de inhibición obtenidos fueron de 61% en FP y 78% en FN (Tabla 47).

Efecto de la fermentación de judías en la capacidad antioxidante total (TEAC)

En la Tabla 48 y Gráfico 10 se recogen los valores obtenidos para la capacidad antioxidante total (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), expresados en $\mu\text{mol trolox/g s.s.}$, de las harinas funcionales de judías.

Las abreviaturas utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ PBS= Tampón fosfato salino pH 7,4
- ♦ MeOH = Metanol
- ♦ DCM = Diclorometano

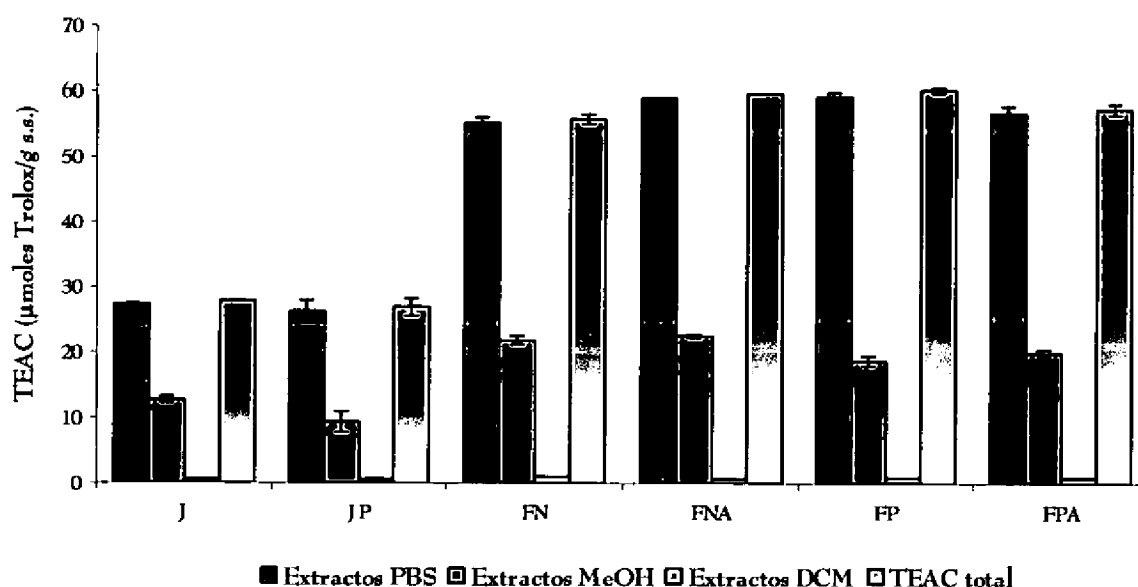
Tabla 48. Efecto de la fermentación de judías sobre la capacidad antioxidante total (TEAC)

<i>Vigna sinensis</i> var. Carilla	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/ g s.s.}$)			
	Extracto hidrofílico		Extracto lipofílico	TEAC Total
	PBS*	MeOH**	DCM*	PBS + DCM extracto***
J	$27,39 \pm 0,04_2^a$	$12,73 \pm 0,51_1^b$	$0,57 \pm 0,03^a$	$27,95 \pm 0,05^b$
JP	$26,31 \pm 1,73_2^a$	$9,37 \pm 1,61_1^a$	$0,68 \pm 0,01^b$	$26,99 \pm 1,33^a$
FN	$55,24 \pm 0,85_2^b$	$21,90 \pm 0,66_1^d$	$0,98 \pm 0,06^d$	$55,85 \pm 0,73^c$
FNA	$59,01 \pm 0,00_2^c$	$22,63 \pm 0,26_1^d$	$0,70 \pm 0,00^b$	$59,71 \pm 0,00^e$
FP	$59,40 \pm 0,49_2^c$	$18,78 \pm 0,79_1^c$	$0,87 \pm 0,03^c$	$60,28 \pm 0,41^e$
FPA	$56,83 \pm 1,03_2^b$	$20,06 \pm 0,56_1^c$	$0,91 \pm 0,04^{cd}$	$57,38 \pm 0,83^d$

* Los valores de la Tabla 47 son valores medios \pm desviación estándar de 2 determinaciones. Idéntico superíndice en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$). Idéntico subíndice en la misma fila indica que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Método A; ** Método B; ***TEAC total = TEAC PBS + TEAC DCM

Gráfico 10: Efecto de la fermentación de judías y calentamiento en autoclave sobre la capacidad antioxidante total



Los extractos hidrofílicos se obtuvieron mediante la utilización de dos disolventes distintos: tampón fosfato salino (PBS) y metanol. El extracto en PBS de las harinas funcionales de judías presentó un TEAC superior al extracto en metanol (Tabla 48, Gráfico 10). Por lo que respecta a los extractos obtenidos en PBS, el TEAC de JP no se modificó significativamente ($P \leq 0,05$) respecto a las judías crudas, mientras que el TEAC de las harinas funcionales de judías fermentadas se duplicó ($59,4 \mu\text{mol trolox/g s.s.}$ en FP y $55,2 \mu\text{mol trolox/g s.s.}$ en FN). El tratamiento en autoclave disminuyó el TEAC (4%) ($P \leq 0,05$) en FPA, mientras que lo incrementó en FNA (6,8%) (Tabla 48, Gráfico 10). En los extractos metanólicos se observó que en JP disminuyó el TEAC, sin embargo en las harinas funcionales de judías fermentadas se encontró un incremento notable del TEAC (47% en FP y 72% en FN). El tratamiento de estas harinas en autoclave no produjo cambios en el TEAC en FPA, mientras que se observó un ligero descenso en FNA (Tabla 48, Gráfico 10) con respecto a las harinas sin calentar.

Los extractos lipofílicos obtenidos con diclorometano (DCM) de las judías crudas presentaron valores de $0,6 \mu\text{mol trolox/g s.s.}$. Durante la preparación de las harinas para el proceso de fermentación se observó un incremento del 19,3%. El TEAC del extracto lipofílico en las harinas funcionales de judías fermentadas aumentó notablemente (53 y 72% para FP y FN, respectivamente) y el posterior tratamiento en autoclave incrementó ligera, pero significativamente ($P \leq 0,05$), el TEAC en FPA, mientras que descendió un 23% en FNA (Tabla 48, Gráfico 10).

El TEAC total en las harinas funcionales de judías (FP y FN) fue superior al de las judías crudas (116% y 100%, respectivamente). El tratamiento en autoclave de las harinas produjo efectos opuestos en FP y FN, ya que en FPA se observó un descenso del TEAC total respecto a FP del 5%, y en FNA un aumento con respecto a FN del 7%.

De acuerdo a los datos recogidos en la Tabla 48 y Gráfico 10, en todos los casos los extractos en PBS presentaron la mayor capacidad antioxidante. Esto puede ser debido a la distinta solubilidad de los compuestos con actividad antioxidante en los disolventes utilizados. El poder extractante de los compuestos con actividad antioxidante por los distintos solventes utilizados fue el siguiente: $\text{PBS} > \text{metanol} > \text{diclorometano}$. El TEAC total se calculó como la suma del TEAC en PBS y del TEAC en DCM (Arnao y col., 2001). Por ello, parece lógico pensar que fueron los compuestos antioxidantes de naturaleza hidrosoluble los que más contribuyeron a la capacidad antioxidante total, y que cuando la extracción se lleva a cabo con metanol no está claro si los antioxidantes extraídos son de naturaleza polar o no polar (Tsuda y col., 1993). Los extractos en DCM contendrán casi exclusivamente antioxidantes de naturaleza hidrofóbica que, a la vista de los resultados obtenidos, contribuyen mínimamente al TEAC total de la muestra.

4.4. Discusión sobre los resultados de harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación

En las judías *Vigna sinensis* var. Carilla se detectó la presencia de sacarosa, rafinosa y estaquiosa. Los valores de carbohidratos observados en esta semilla se encuentran dentro los rangos obtenidos por otros autores (Egounlety y Aworh, 2003; Ibrahim y col. 2002; Onyenekwe y col. 2000 y Priyawiwatkul y col. 1996), los cuales indican un contenido de sacarosa entre 1,8-3,1%, de rafinosa entre 0,40%-1,22% y de estaquiosa entre 2,04%-3,88%. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la fermentación, tanto natural como con *L. plantarum*, reduce considerablemente el contenido en α -galactósidos. Egounlety y Aworh (2003) observaron el descenso en los niveles de α -galactósidos en la fermentación de *Vigna unguiculata* con *Rhizopus oligosporus* para la producción de tempeh durante 48 h. La verbascosa desapareció completamente y la estaquiosa disminuyó un 75%, sin embargo el contenido en rafinosa permaneció prácticamente constante. Ibrahim y col. (2002) pusieron de manifiesto la total eliminación de rafinosa y estaquiosa durante la fermentación de *Vigna unguiculata* con *Rhizopus oligosporus* y *L. plantarum*. Akinyele y Akinlosotu (1991) observaron el efecto de la fermentación natural de *Vigna unguiculata* en el contenido de carbohidratos, observando un incremento de sacarosa del 8,1%, y la presencia de fructosa, glucosa y galactosa en la harina fermentada. Estos autores detectaron un incremento del 12,8% en rafinosa y descensos del 79,7% en verbascosa y 5,9% en estaquiosa. Granito y col. (2002) observaron un gran descenso en el contenido de α -galactósidos en harinas de judías (*Phaseolus vulgaris*) fermentadas de forma natural, así como una disminución de sacarosa y fructosa, un aumento de glucosa y detectaron el monosacárido galactosa, ausente en la semilla cruda. Resultados semejantes encontraron Barampana y Simard (1994) en la fermentación de *Phaseolus vulgaris* con *L. fermentum* durante 72 h, donde se redujo considerablemente el

contenido en α -galactósidos. Czarnecka y col. (1988) observaron que la fermentación de judía “Bomba” con *L. plantarum* durante 18 h y Duszkievicz-Reinhard y col. (1994) en la fermentación de judías pintas con *L. plantarum* y *L. fermentum* durante 72 h se producían drásticas reducciones en los oligosacáridos de dichas leguminosas.

El contenido en ácido fítico de *Vigna sinensis* var. Carilla es algo inferior a la información que ofrece la bibliografía. Marconi y col. (1997) indican en distintas variedades de *Vigna* contenidos de ácido fítico que oscilan entre 0,56%-1,17%, Egounlety y Aworth (2003) observaron en *Vigna sinensis* un contenido de 0,46% en ácido fítico, mientras que Ibrahim y col. (2002) en la misma leguminosa obtienen un 4,54%. Como hemos observado los procesos de fermentación ensayados produjeron un brusco descenso del contenido en ácido fítico, hecho que está en consonancia con lo obtenido por otros autores. Egounlety y Aworth (2003) y van der Riet y col. (1987) observaron que como consecuencia de la fermentación de judías (*Vigna sinensis*) y soja con *Rhizopus oligosporus* durante 48 h y 72 h, se producía un descenso de ácido fítico del 54% y 88%, respectivamente. Ibrahim y col. (2002) observaron que la fermentación de judías (*Vigna sinensis*) con *Rhizopus oligosporus* durante 48 h y *L. plantarum* durante 36 h, se producía una disminución del contenido de ácido fítico del 39% y 47%, respectivamente. Akpapunam y Achinewhu (1985) encontraron descensos en el ácido fítico del 70% en la fermentación natural de *Vigna sinensis* durante 72 h. Granito y col. (2002) observaron descensos entre 7%-39% en IP₆ durante la fermentación natural de judías, dependiendo de la concentración de la suspensión de harina utilizada para la misma. Gustafsson y Sandberg (1995) encontraron que en la fermentación natural de judías durante 48 h el ácido fítico (IP₆) descendió un 86%. Kozłowska y col. (1996) observaron que en la fermentación natural de lentejas durante 96 h se producían descensos en IP₆, IP₅ e IP₄ y un incremento en IP₃, con una disminución final del total de inositol

fosfatos presentes del 70-75%. Svanberg y Lorri (1997) observaron que durante la fermentación se producía la activación de las fitasas endógenas de las semillas y que estas eran las responsables de la hidrólisis de los inositol fosfatos, e Irving (1980) afirmó que las fitasas de origen vegetal presentan un pH óptimo a 4-6, condiciones que se consiguen durante el proceso de fermentación.

La actividad inhibidora de tripsina en *Vigna sinensis* var. Carilla se encuentra dentro del rango que otros autores observan para semillas del género *Vigna*. Marconi y col. (1997) e Ibrahim y col. (2002) encontraron valores de 29,65 TIU/mg s.s. y 17,22 TIU/mg s.s. (65 TIU/mg proteína) en *Vigna unguiculata*, respectivamente. Abd El-Hady y Habiba (2003), Alonso y col. (2000) y Granito y col. (2002) encontraron un contenido de TIA de 19,50 TIU/mg s.s., 3,10 TIU/mg s.s. y 10,30 TIU/mg s.s. en judías, respectivamente. Los procesos de fermentación estudiados produjeron reducciones considerables de la actividad inhibidora de tripsina los cuales eran más acusados cuando se aplicaba tratamiento térmico con autoclave. Ibrahim y col. (2002) publicaron que en la fermentación de judías (*Vigna sinensis*) con *L. plantarum* durante 36 h se producía una disminución del 96,90% en TIA, e incluso en la fermentación con *Rhizopus oligosporus* durante 48 h desaparecía completamente. Egounlety y Aworth (2003) observaron la total desaparición de TIA en la fermentación de judías (*Vigna sinensis*) con *Rhizopus oligosporus* durante 48 h. Granito y col. (2002) encontraron descensos del 58%-71% en TIA en la fermentación natural durante 48 h a 42°C de harinas de judías y grano entero, respectivamente. Rodríguez-Bürger y col. (1998) pusieron de manifiesto que en la fermentación de judías con *Rhizopus oligosporus* durante 15 h, 20 h y 25 h los niveles de TIA desaparecían totalmente. Frías y col. (2000) observaron que la forma de aplicación del calor en garbanzos influía en los niveles de inhibidores de tripsina, ya que desaparecían cuando se sometían a tratamiento de cocción en agua durante 35 minutos, mientras que cuando el calentamiento se producía con calor seco a

120°C, 1 atm durante 15 minutos, la reducción sólo era del 27%. Hung y col. (1984) demostraron que el contenido en TIA descendió notablemente durante el tratamiento de lentejas con microondas durante 2 minutos. Márquez y col. (1998) observaron que al aplicar en garbanzos calor seco a 140°C durante 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h los niveles de TIA descendían al aumentar el tiempo de calentamiento, desapareciendo a las 24h.

El contenido en almidón total y disponible en *Vigna sinensis* var. Carilla fue semejante a lo observado por Henshaw y col. (2003) en distintas variedades de *Vigna sinensis*, donde el contenido en almidón total oscilaba entre 47,8%-56%. Los efectos que hemos observado que produce la fermentación sobre el contenido en almidón son similares a lo que distintos autores indican para otras leguminosas. Granito y col. (2002) observaron que la fermentación natural durante 48 h de judías grano o de harinas de judías producía un descenso del contenido de almidón total y disponible entre 5%-10% y 16%-27%, respectivamente. Similares resultados fueron obtenidos por van der Riet y col. (1987) en la obtención de tempeh. Sin embargo, Rodríguez-Bürger y col. (1998), Urooj y Puttaraj (1994) y Barampana y Simard (1994), no observaron cambios en el contenido de almidón después de la fermentación judías con *Rhizopus oligosporus*, de forma natural y con *L. fermentum*.

El contenido de tiamina y riboflavina en *Vigna sinensis* var Carilla es similar al indicado por otros autores en leguminosas del género *Vigna*. Deshpande y col. (2000) observaron valores de 1,05 mg/100g s.s. en tiamina y de 0,21 mg/100g s.s. en riboflavina. El efecto de la fermentación sobre el contenido en dichas vitaminas es semejante a la información que ofrece la bibliografía. Prinyawiwatkul y col. (1996) observaron que el contenido de riboflavina aumentaba durante la fermentación de *Vigna sinensis* con *Rhizopus oligosporus*. Zamora y Fields (1979) observaron que los niveles de tiamina no se modificaban como consecuencia de la fermentación natural de *Vigna sinensis*

durante 96 h, sin embargo se produjo un incremento del 18% en el contenido de riboflavina. Granito y col. (2002) encontraron un descenso en tiamina y un aumento en riboflavina durante la fermentación natural de judías. Vidal-Valverde y col. (1997) pusieron de manifiesto que la fermentación de lentejas no producía cambios o ligeras modificaciones del contenido en tiamina, mientras que el contenido de riboflavina se incrementaba considerablemente. Van der Riet y col. (1987) observaron que la fermentación de soja con *Rhizopus oligosporus* producía la eliminación de tiamina y un incremento de riboflavina. Por otra parte, Akinyele y Akinlosotu (1991) pusieron de manifiesto que la fermentación de *Vigna unguiculata* durante 24 h producía un importante incremento en los niveles de tiamina. Kazana y Fields (1981) atribuyeron el aumento de riboflavina a su síntesis por parte de microorganismos del género *Lactobacillus* y *Pediococcus* presentes durante la fermentación, además, según estos autores, el contenido de tiamina en los productos fermentados no depende solamente del tipo de leguminosa y condiciones utilizadas, sino también del microorganismo presente durante la fermentación. Así, Keuth y Bisping (1993) afirmaron que varios microorganismos del género *Lactobacillus* no eran capaces de producir tiamina y sí riboflavina durante la preparación de tempeh y, sin embargo, Denter y Bisping (1994) observaron un incremento en tiamina en presencia de *Citrobacter freundii* en la producción de tempeh.

En *Vigna sinensis* var. Carilla no se ha observado la presencia de vitamina C. Plaza y col. (2003) encontraron que el contenido en vitamina C varía entre la no detección en lentejas y judías hasta un 10mg/100g en arvejas y soja. No se han encontrado referencias bibliográficas acerca del efecto de la fermentación en el contenido en vitamina C en judías. Frías y col. (2004) observaron la total desaparición de vitamina C después de fermentar harinas de altramuza con *L. plantarum* y de forma natural. Hybenová y col. (1995) publicaron que durante la fermentación con *L. plantarum* y *L. delbrueckii* de repollo y zumo de zanahoria se

producía un descenso de vitamina C de entre 6-26%. El descenso fue más acusado durante las primeras horas del proceso y lo atribuyeron a la influencia del pH, ya que el ácido ascórbico es más estable a pH inferiores a 4,0 que se alcanzan a medida que va evolucionando la fermentación ácido láctica.

El contenido en tocoferoles y en actividad vitamínica E de *Vigna sinensis* var. Carilla fue semejante a lo encontrado por otros autores en diferentes leguminosas. Wyatt y col. (1998) observaron que el mayor isómero de los tocoferoles presentes en lentejas, garbanzos y judías correspondía al γ -tocopherol, oscilando la actividad vitamínica entre un 0,09 mg α -TE/100g s.s en judías hasta 3,54 mg α -TE/100g s.s en garbanzos. Sheppard y col., (1993) detectaron una actividad vitamínica E en judías de 0,7 mg α -TE /100g. Tsuda y col. (1993) observaron en distintas leguminosas del género *Vigna*, que los isómeros γ - y δ -tocopherol eran los vitámeros mayoritarios (11,5 mg/100g s.s. γ -tocopherol en *Vigna radiata* y 8,1 mg/100g s.s. δ -tocopherol en *Vigna unguiculata*), mientras que el α -tocopherol y β -tocopherol o no se detectaban o aparecían en cantidades muy bajas.

No se han encontrado referencias bibliográficas acerca del efecto de la fermentación en el contenido en tocoferoles y su actividad vitamínica en judías *Vigna sinensis*. En otras leguminosas, Matsou (1997) detectó en okara koji, un producto fermentado de soja con *Aspergillus oryzae*, la presencia de γ - y δ -tocopherol, sin embargo no se observó la presencia de α -tocopherol. Esaki y col. (1994) observaron que en productos de soja fermentada con *Aspergillus oryzae* (miso), *Bacillus natto* (natto) y con *Rhizopus oligosporus* (tempeh) el contenido en tocoferoles no se modificó (en natto o tempeh) o disminuyó (en miso). Denter y col. (1998) encontraron que durante la fermentación de soja con *Rhizopus* para producir tempeh el contenido en tocoferoles libres descendió, sin embargo el total de vitamina E permaneció constante. Frías y col. (2004) observaron un incremento en α -tocopherol y descensos en γ - y δ -tocopherol cuando se fermentó altramuza de forma natural, sin embargo, se produjo un descenso considerable en

todos los tocoferoles presentes en el altramuz después de fermentar las harinas con *L. plantarum*. En ambos casos la actividad vitamínica E (α -TEs) descendió notablemente después de la fermentación.

En las judías objeto de nuestro trabajo no se detectó la presencia de carotenoides. Otros autores como Kantha y Erdman (1987) o Atienza y col. (1998) encontraron un contenido de β -caroteno que oscilaba entre 0,23-3,34 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y de 9-68 $\mu\text{g}/100\text{g}$ en judías. El-Difrawi y Hudson (1979) observaron valores de β -caroteno en 4 especies de altramuz entre 23-142 $\mu\text{g}/100\text{g}$, sin embargo Monma y col. (1994) no detectaron niveles de β -caroteno en diferentes variedades de soja.

No se ha encontrado información sobre el efecto de la fermentación de judías en el contenido de carotenoides. En otras leguminosas, Denter y col. (1998) observaron un significativo aumento del contenido en β -caroteno durante la fermentación de soja con *Rhizopus* para la obtención de tempeh, debido a que dicho microorganismo tenía la capacidad de producir β -caroteno.

Los inositol fosfatos menos fosforilados están adquiriendo hoy día gran importancia desde el punto de vista fisiológico. Así, el Ins (1,4,5) P_3 está considerado como un importante segundo mensajero, origina el relevo de Ca^{+2} de los depósitos intracelulares, participando en una gran número de procesos celulares. El Ins (1,3,4,5) P_4 actúa incrementando el calcio intracelular cuando se encuentra presente el Ins (1,4,5) P_3 , considerado como factor movilizador de Ca^{+2} (Berridge e Irving, 1989). Por lo tanto, la determinación de los distintos inositol fosfatos en alimentos es de un enorme interés. Algunos de los inositol fosfatos que nosotros hemos detectado mediante RMN ^1H , también han sido identificados por otros autores mediante cromatografía HPIC con la ayuda de patrones. Sandberg y col. (1999) también han identificado Ins (1,2,3,4) P_4 , Ins (1,4,5) P_3 , e Ins(1,2,4) P_3 en pan de trigo, mientras que en pan de centeno identificaron Ins

(1,2,3,4,5)P₅, Ins (1,3,4,5)P₄, Ins (1,2,3,4)P₄ e Ins (1,2,4)P₃, entre otros inositoles parcialmente fosfatados. Otros inositol fosfatos como Ins (1,2,3,4,5)P₅, Ins (1,2,3,5,6)P₅ e Ins (1,2,3,4)P₄ han sido identificados por Fredrikson y col. (2001) en guisantes fermentados. Por cromatografía HPIC se pueden identificar de InsP₃ a InsP₆, pero persisten las dificultades para identificar los derivados menos fosfatados como (InsP₁ e InsP₂). Por lo tanto, la técnica de RMN ¹H es una herramienta alternativa a la cromatografía HPIC para la identificación de inositol fosfatos en alimentos.

En las semillas de judías crudas (*Vigna sinensis* var. Carilla) se observó un contenido en GSH (glutation reducido) de 3,25 μmol/g s.s. y de glutacion oxidado (GSSG) de 0,6 μmol/g s.s. No se han encontrado referencias bibliográficas sobre el contenido en glutacion en *Vigna sinensis*. Burkey y col. (2000) obtuvieron en distintas semillas de *Phaseolus vulgaris* valores de glutacion total (reducido+oxidado) que oscilaron entre 0,11 y 0,22 μmoles de GSH/ g s.s. Fernández-Orozco y col., (2002) encontraron en dos variedades de lentejas valores de GSH comprendidos entre 0,97-1,5 μmol/g s.s. Distintos autores obtuvieron en cereales valores de GSH entre 0,53 y 4,37 μmol/g s.s y en semillas de crucíferas cifras comprendidas entre 0,3-1,6 μmol/g s.s. (Zielinski y col. 1999; Zielinski y col. 2002). No se han encontrado referencias sobre el efecto de la fermentación de judías en los niveles de GSH o GSSG. En distintas variedades de lentejas españolas, Fernández-Orozco y col. (2002) observaron que los valores de GSH disminuyeron notablemente con la cocción. Jones y col. (1999) observaron un contenido en GSH de *Vigna sinensis* y *Phaseolus vulgaris* enlatadas y cocinadas de 1,3 mg/100g peso fresco y 0,6 mg GSH/100g peso fresco, respectivamente, valores muy inferiores a los obtenidos en las harinas funcionales de judías fermentadas.

La actividad SOD observada en las judías crudas fue muy similar al obtenido en lentejas por Fernández-Orozco y col. (2002). No se han encontrado referencias bibliográficas sobre el efecto de la fermentación en la actividad de SOD de judías. Con respecto a los tratamientos térmicos, Fernández-Orozco y col. (2002) observaron un drástico descenso en la actividad SOD en distintas variedades de lentejas sometidas a proceso de cocción. En diferentes cereales, Zielinski y col. (2000) detectaron un severo descenso en la actividad SOD cuando se les sometió al proceso hidrotérmico de extrusión. Estos resultados difieren a los obtenidos en las harinas funcionales de judías fermentadas y sometidas a autoclave en las que este tratamiento térmico no modificó la actividad SOD.

El PRTC de las harinas funcionales de judías era inferior al de las judías crudas a pesar de que aumentó el contenido en los compuestos fenólicos tirosol y quercetina, como fue observado por Dueñas y col., (2004). Nuestros resultados difieren con los publicados por Fernández-Orozco y col., (2002) que encontraron una contribución de los compuestos fenólicos totales al PRTC de distintas variedades de lentejas españolas de 96,2% y del 77,6% en lentejas cocidas y germinadas, respectivamente. Distintos autores han observado en lentejas, soja y alfalfa que el PRTC es distinto según se extraiga con tampón o metanol, dependiendo del tipo de leguminosa y del tipo de proceso llevado a cabo (Fernández-Orozco y col., 2002; Zielinski, 2002). No se han encontrado referencias bibliográficas que relacionen la capacidad para atrapar radicales peroxilo y la fermentación de judías. Sobre el efecto del proceso térmico en PRTC, Fernández-Orozco y col., (2002), pusieron de manifiesto que el proceso de cocción en lentejas producía diferentes resultados, dependiendo de la variedad de lenteja estudiada y del tipo de solvente utilizado para la extracción de los compuestos antioxidantes.

El método de inhibición de PC empleando liposomas es a menudo usado como un modelo para estudiar la actividad antioxidante *in vitro*, ya que los liposomas pueden estar relacionados con las estructuras lamelares de las membranas biológicas encontradas *in vivo* (Chatterjee y Agarwal, 1998). Así, la mayor parte de los artículos encontrados en la bibliografía están basados en este sistema modelo con el fin de evaluar la capacidad antioxidante para inhibir la peroxidación de PC de determinados compuestos puros con carácter antioxidante, como por ejemplo epicatequina, galato de epicatequina y quercetina o vitamina E (Terao y col. 1994; Koga y col. 1996). En nuestra determinación se usó AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro) como iniciador de la peroxidación de PC, azo-iniciador frecuentemente utilizado para esta peroxidación en los sistemas que emplean liposomas (Niki, 1987). Frías y col. (2004) adaptaron el método descrito por Terao y col. (1994) a leguminosas con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de altramuз fermentado y germinado. Estos autores encontraron ligeros cambios en la inhibición de la peroxidación de PC entre el altramuз crudo y fermentado tanto natural como con *L. plantarum*, mientras que se incrementaba con los días de germinación del lupino.

Troszynska y Ciska (2002) evaluaron la inhibición de la peroxidación de PC en extractos de acetona y metanol de la testa de dos variedades de guisante. Los extractos de la variedad de guisante coloreada presentaron una fuerte capacidad antioxidante y dependía del grado de polimerización de los taninos. En el caso de la testa de la semilla de guisante blanca, la capacidad antioxidante se relacionó con la presencia de ácidos cinámicos (ferúlico, caféico y cumárico).

Azuma y col. (1999) observaron el efecto en la inhibición de la peroxidación de PC en un sistema de liposomas de extractos etanólicos de 25 vegetales. Los porcentajes de inhibición oscilaron entre 0-99%. De los 25 vegetales estudiados, aquellos que eran ricos en ácido ascórbico y pobres en polifenoles, presentaron una inhibición de la peroxidación de PC durante el

tiempo inicial de reacción, al contrario que los extractos que presentaban un bajo contenido en ácido ascórbico y alto en polifenoles, en el que la capacidad de inhibición se mantuvo durante más tiempo. Esto sería debido a que, aunque la capacidad de secuestrar radicales del ácido ascórbico es alta, una molécula sólo es capaz de secuestrar un radical, mientras que los polifenoles poseen varios puntos en su estructura capaces de secuestrar a varios radicales.

En las harinas funcionales de judías la capacidad para inhibir la peroxidación de PC puede ser debido a la presencia de determinados compuestos de carácter antioxidante distintos de vitamina C, entre ellos polifenoles, y de hecho se ha observado en dichas harinas funcionales de judías que existe una correlación positiva ($r = 0,85$) entre polifenoles totales (Hernández 2004, comunicación personal) y la capacidad para inhibir la peroxidación de la PC. El mayor porcentaje de inhibición que presentan las harinas fermentadas sometidas al tratamiento de autoclave puede ser debido a la presencia de hidroximetilfurfuraldehído, producto de la reacción de Maillard con un elevado poder antioxidante (Dueñas y col., 2004).

Son muy escasos los datos que ofrece la bibliografía sobre la capacidad antioxidante total en judías. Tsuda y col. (1993) evaluaron la capacidad antioxidante total de los extractos metanólicos de 35 leguminosas comestibles utilizando el método del ácido tiobarbitúrico. La judía de ojo negro o cowpea (*Vigna unguiculata*) no mostró capacidad antioxidante, mientras que otras judías del género *Vigna* (*Vigna angularis*, *Vigna radiata*, *Vigna mungo*, *Vigna umbellata*) y del género *Phaseolus* (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus cosinneus*, *Phaseolus lunatas*), junto con soja (*Glycine max*) y guisante (*Pisum sativum*) fueron las que mostraron una capacidad antioxidante más intensa. Otras leguminosas como lentejas (*Lens culinaris*) y garbanzos (*Cicer arietinum*) no mostraron capacidad antioxidante por éste método. En diferentes variedades de lentejas, Fernández-Orozco y col. (2003) evaluaron la capacidad antioxidante total (TEAC) de extractos en PBS y

encontraron valores comprendidos entre 13 y 23 $\mu\text{moles trolox/g s.s.}$, cifras que se encuentran en concordancia con los que hemos obtenido para *Vigna sinensis* var. Carilla en este trabajo. Lin y col., (2001) mostraron que los extractos de judías (*Phaseolus radiatus*, *Phaseolus aureus*, *Phaseolus calcaratus*) y soja (*Glycine max*) obtenidos en agua caliente durante 1 h presentaron un elevado potencial antioxidante frente a la peroxidación lipídica, frente a la formación de radicales superóxido y como actividad secuestradora de radicales libres.

La bibliografía señala alguna información acerca del efecto de la fermentación de leguminosas sobre la capacidad antioxidante total. Dueñas y col. (2004) pusieron de manifiesto que la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de *Vigna sinensis* var. Carilla se incrementaba después de la fermentación, observando que el DPPH de las judías crudas (9,44) disminuía a 8,89 y 9,02 en las harinas FP y FN, respectivamente, valores que están en consonancia con el TEAC obtenido por nosotros. Dueñas y col (2004) pusieron de manifiesto la presencia de tirosol y quercetina en las harinas funcionales de judías fermentadas, compuestos que presentan carácter antioxidante, hecho que podría relacionarse con el aumento en el TEAC total observado por nosotros y en la disminución de DPPH observado por Dueñas y col (2004) en dichas harinas funcionales. En los extractos en DCM el incremento en el TEAC puede ser debido a la actividad vitamínica de los tocoferoles presentes en las muestras fermentadas con *L. plantarum*, debido a que existe una correlación positiva entre el TEAC y el contenido en actividad vitamínica E ($r = 0,61$). Sin embargo, dicha correlación no se puso de manifiesto en la fermentación natural, debido a que los tocoferoles no se modificaron durante dicho proceso fermentativo y, por lo tanto, el incremento en el TEAC puede ser debido a otros compuestos de naturaleza hidrofóbica presentes en las muestras.

Chung y col. (2002) observaron que la capacidad antioxidante de un extracto etanólico al 50% de *Phaseolus radiatus* fermentado con *Bacillus subtilis*

IMR-NK1 se incrementaba con la concentración del extracto, y era inferior a la que presentaba el α -tocoferol y BHT. Frías y col. (2004) observaron que la fermentación de altramuza con *L. plantarum* aumentaba un 5% la capacidad antioxidante total en el extracto hidrofílico (PBS), sin embargo no observó diferencias significativas en la fermentación natural del lupino. Esaki y col. (1994) encontraron que productos de soja fermentada con *Aspergillus oryzae* (miso), *Bacillus natto* (natto) y con *Rhizopus oligosporus* (tempeh) eran más estables a la peroxidación lipídica que las semillas de soja cruda. Según estos autores, los resultados indican que durante la fermentación se pueden producir distintos compuestos con marcado carácter antioxidante. Comprobaron que en los tres casos el aumento de dicha capacidad antioxidante no era debido a un aumento en el contenido en tocoferoles (compuestos considerados como los antioxidantes lipofílicos biológicos por excelencia), ya que sus niveles no se modificaron (en natto ó tempeh) o disminuyeron (en miso) durante el proceso fermentativo, si no que este aumento en la capacidad antioxidante en tempeh y miso podría ser debido a la presencia de isoflavonas libres (daidzeína y genisteína) que fueran liberadas durante la fermentación por acción de la β -glucosidasa. En el caso de natto, debido a que no se observó un cambio significativo en el contenido de isoflavonas libres, el aumento en la capacidad antioxidante lo atribuyeron a otros compuestos de carácter hidrofílico. Semejantes resultados fueron publicados por Murakami y col., (1984) en tempeh, que observaron una liberación de daidzeína y genisteína durante la fermentación de soja, isoflavonas a las que atribuyeron el principal papel antioxidante de este producto. Por otra parte, Hoppe y col. (1997) achacaron el aumento de la capacidad antioxidante observada en un extracto de tempeh a la acción sinérgica de los tocoferoles presentes en la soja y los aminoácidos liberados durante el proceso fermentativo con *Rhizopus oligosporus*. En natto, Yokota y col. (1996) obtuvieron un preparado rico en antioxidantes (extracto en etanol al 99,5% y posterior concentración) y al

administrarlo en la dieta de conejos observaron que disminuía el colesterol total, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos.

Otros miembros del equipo investigador que formaban parte de los proyectos de investigación: “Optimización de procesos de fermentación para la obtención de nuevos alimentos funcionales de leguminosas. Valoración química (AGL 2000-1609-C02-01)” y “Procesos biotecnológicos para incrementar la capacidad antioxidante de leguminosas, (AGL 2002-02905 ALI)”, estudiaron también estas harinas funcionales de judías obtenidas en condiciones óptimas de fermentación. Martín-Cabrejas y col. (2004) observaron que las judías presentaban bajo contenido en lectinas y α -amilasa, pero niveles altos de inhibidor de quimotripsina en comparación con otras leguminosas, y no detectaron glucósidos cianogénicos. Como es sabido, estos factores antinutritivos producen efectos negativos o tóxicos en los mamíferos. Dichos autores observaron que en las harinas funcionales FN y FP disminuían los niveles de lectinas, mientras que era necesario el calentamiento en autoclave, FNA y FPA, para disminuir los inhibidores de quimotripsina en 57% y 45%, respectivamente, y el contenido en lectinas no llegar a detectarse. Dichos autores también observaron que, aunque en las harinas funcionales de judías sólo se producían escasos cambios en el contenido total de fibra, disminuía el contenido en fibra soluble y se producían cambios en la composición cualitativa de la fibra. Porres y col. (2003) observaron que la diazibilidad de N, P, Cu y Mg se incrementaba en FN y FP, mientras que la del Zn disminuía y la del Fe se incrementaba en FN. La aplicación de autoclave a las harinas (FNA y FPA), dio lugar a un significativo incremento de la dializabilidad de Fe y una reducción acusada de la del Zn.

En las harinas funcionales de judías, Dueñas y col. (2004) observaron que la fermentación de *Vigna sinensis* var. Carilla modificaba el contenido de polifenoles. Estos autores detectaron en las harinas fermentadas la presencia de

tirosol y quercetina (7 $\mu\text{g/g}$ y 89 $\mu\text{g/g}$ de tirosol y 22 $\mu\text{g/g}$ y 11 $\mu\text{g/g}$ de quercetina en FP y FN, respectivamente), ausentes en la semilla cruda, así como un descenso en el DPPH, como se ha indicado anteriormente.

4.5. Conclusiones sobre las harinas funcionales de judías obtenidas mediante fermentación

1. Las condiciones óptimas para obtener harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) mediante fermentación natural o con *Lactobacillus plantarum* son: concentración de harina 300g/L, temperatura 37°C y agitación de 450 rpm durante 48 h.
2. El proceso de fermentación natural o con *Lactobacillus plantarum* en las harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) produce reducciones del contenido en α -galactósidos del 95%-87%, en inositol hexafosfatos del 85% y en la actividad inhibidora de tripsina del 50%-26%, respectivamente. Cuando estas harinas se someten a calentamiento en autoclave se produce una drástica reducción de la actividad inhibidora de tripsina (80% y 55%, respectivamente).
3. El proceso de fermentación natural o con *Lactobacillus plantarum* produce harinas funcionales de judías (*Vigna sinensis* var. Carilla) con ligeros cambios en el contenido en carbohidratos disponibles, un menor contenido en tiamina y un mayor contenido en riboflavina. La actividad vitamínica E aumenta cuando la fermentación se lleva a cabo con inóculo.
4. La aplicación de la técnica de RMN ^1H a la identificación de inositol fosfatos en harina funcionales de judías obtenidas mediante fermentación natural puso de manifiesto la presencia de los siguientes inositol fosfatos, algunos de ellos de gran interés biológico: 1 inositol hexafosfato: InsP_6 ó ácido fítico; 2 inositol pentafofosfatos: $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ e $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$; 1 inositol

tetrafosfato: Ins(1,3,4,5)P₄; 2 inositol trifosfatos: Ins(1,2,4)P₃ e Ins(1,4,5)P₃; 1 inositol difosfato: Ins (1,4)P₂ y 3 inositol monofosfatos: Ins (2)P₁, Ins (1)P₁ o Ins(3)P₁, Ins (2)P₁.

5. Las harinas funcionales de judías fermentadas presentan una reducción de las enzimas antioxidantes GSH y SOD, así como una menor capacidad para atrapar radicales peroxilo.
6. La fermentación produce en las harinas funcionales de judías una mayor capacidad para inhibir la peroxidación lipídica *in vitro* y una mayor capacidad antioxidante total.

V. CONCLUSIÓN GENERAL

V. CONCLUSIÓN GENERAL

Las harinas funcionales de leguminosas obtenidas, bien por acción enzimática, o bien mediante el proceso de fermentación, presentan un contenido mínimo de factores antinutritivos, un nivel adecuado de nutrientes, y la presencia de nuevos compuestos bioactivos, por lo que son de indudable interés desde el punto de vista nutricional para la industria alimentaria, ya que pueden entrar a formar parte de nuevos alimentos con un gran valor añadido.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ♦ Abd El-Hady E.A. y Habiba R.A. "Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds" *Lebensm.-Wiss U.-Technol.* 36:285-293 (2003).
- ♦ Aguilar C.N. y Gutiérrez-Sánchez G. "Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase". *Food Science Technology International*, 7:373-382 (2001).
- ♦ Akinyele I.O. y Akinlosotu A. "Effect of soaking, dehulling, and fermentation on the oligosaccharides and nutrient of cowpeas (*Vigna Unguiculata*)". *Food Chemistry* 41:43-53 (1991).
- ♦ Akpapunam M.A. y Achinewhu S.C. "Effects of cooking, germination and fermentation on the chemical composition of Nigerian Cowpea (*Vigna unguiculata*)". *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.* 35:353-358 (1985).
- ♦ Alani S.R., Smith D.M. y Markakis P. "Alpha-galactosidases of cowpeas (*V. Unguiculata*)". *Phytochemistry* 28:2047-2051 (1989).
- ♦ Alani S.R., Smith D.M. y Markakis P. "Changes in Alpha-galactosidase activity and oligosaccharides during germination and incubation of cowpeas (*V. Unguiculata*)". *Food Chemistry* 38:153-158 (1990).
- ♦ Aliya S. Y Geervani P. "An assessment of the protein quality and vitamin B content of commonly used fermented products of legumes and millets". *J. Sci. Food Agric.*, 32:837-842 (1981).
- ♦ Alonso R., Aguirre A. y Marzo F. "Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans". *Food Chemistry*, 68:159-165 (2000).

- Alonso J., Cristobal D. "La lenteja". En: El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León. Publicaciones de la Consejería de Agricultura y Ganadería (1998).
- Anderson J., Deakins D., Floore T., Smith B. y White S. Critical Review and Food Science Nutrition, 95-147 (1990).
- Anderson J.W. y Tietzen-Clark J. "Dietary fiber: hyperlipidemia, hypertension, and coronary heart disease". American Journal Gastroenterol, 81:907 (1986).
- Antezana J.R. "Modificaciones térmicas y enzimáticas, y su influencia sobre ácido fólico y fibra alimentaria en harinas de leguminosas". Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España, Tesis Doctoral (2002).
- Antezana J.R., Esteban R.M., Jaime L., Martín-Cabrejas M.A., Gago L., de la Cruz M., López-Andreu F.J. y Mollá E. "Efecto de la adición de enzimas sobre la fibra alimentaria de *Pisum sativum* L.". 2º Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Orihuela, Murcia (2003).
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S. y Robards K. "Methods for testing antioxidant activity". Analyst, 127:183-198 (2002).
- Arai S. "Global view on functional foods: Asian perspectives". British Journal of Nutrition, 88, suppl. 2, S139-S143 (2002).
- Arnao M.B., Cano A. y Acosta M. "Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology". Recent Res. Devel. Agric. Food Chem., 2, 893-905 (1998).
- Arnao M.B., Cano A. y Acosta M. "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity". Food Chemistry 73:239-244 (2001).

- ♦ Asociación Española de Leguminosas (2002). (Web: infoagro.com)
- ♦ Atienza J., Sanz M., Herguedas A., Alejos J.A., Jiménez J.J. "β-Carotene, α-tocopherol and γ-tocopherol contents in dry legumes. Influence of cooking". Food Sci. Tech. Int., 4, 6, 437-441 (1998).
- ♦ Ayda S. y Elbein A.D. "Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*: Purification and properties of α-galactosidase". Journal of Bacteriology 129:850-856 (1977).
- ♦ Azuma K., Ippoushi K., Ito H., Higashio H. y Terao J. "Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers". J. Sci. Food Agric., 79, 2010-2016 (1999).
- ♦ Barampana Z. y Simard R.E. "Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing". Journal of Food Science 59 (4), 833-838 (1994).
- ♦ Barampana Z. y Simard R.E. "Effect of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans". Plants Foods Human Nutr. 48:349-365 (1995).
- ♦ Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D. y Bartosz M. "Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity". Biochem. Mol. Biol. Int., 46, 519-528 (1998).
- ♦ Bau H.M., Villaume Ch. y Méjean L. "Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats". Nahrung 44(1), S2-6 (2000).
- ♦ Bedford M.R. y Classen H.L. "Reduction of intestinal viscosity through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and

- results in improved growth rate and fod conversion efficiency of broiler chicks". *Journal of Nutrition* 122:560-569 (1992).
- **BeMiller J.N. y Whistler R.L.** "Starch" En: Fennema, O.R. (ed.) Marcel Dekker, New York, Food Chemistry.191-204 (1996).
 - **Bernabé M., Fenwich R., Frías J., Jiménez-Barbero J., Price K., Valverde S. y Vidal-Valverde C.** "Determination, by NMR Spectroscopy, of the Structure of Ciceritol, a Pseudotrisaccharide Isolated from Lentils". *J. Agric. Food Chem.* 41:870-872 (1993).
 - **Berridge M.J. e Irvine R.F.** "Inositol phosphates and cell signalling". *Nature (London)*, 341:197-205 (1989).
 - **Beuchat L.R.** *Biotechnology*, (H.J. Rehm, G. Reed) vol. 5, p. 477, Verlag Chemie, Weinheim, fed. Rep. Germany (1983).
 - **Bjorck I., Granfeldt Y., Liljeberg H. y Tovar J.** "Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates". *American Journal Clinical Nutrition*, (59) 699-705 (1994).
 - **Boulter D.** "Quality problems in protein plants with special attention paid to the protein of legumes en: protein quality from leguminous crops". Comisión de la CEE. Bruselas, Bélgica (1997).
 - **Bradford M.M.** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976).
 - **Brearley C.A. y Hanke D.E.** "Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *spirodela polyrrhiza* L.". *Biochem. J.* 314:227-233 (1996).

- ♦ Brune M., Rossander L. y Hallberg L. "Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures". *European Journal of Clinical Nutrition* 43, 57-558 (1989).
- ♦ Burkey K.O., Wei C., Eason G., Ghosh P. y Fenner G.P. "Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and tolerant genotypes of snap bean". *Physiologia Plantarum*, 110, 195-200 (2000).
- ♦ Burkitt D.P., Walker A.R.P. y Painter N.S. "Effect of dietary fibre in stools and transit times and its role in the causation of disease". *Lancet* 2:1408 (1972).
- ♦ Cadenas E. y Packer L. "Handbook of antioxidants". New York: Marcel Dekker, Inc. (2002).
- ♦ Camacho L., Sierra C., Marcus D., Guzmán E., Andrade M., Campos R., Díaz N., Parraguez M. y Trugo L. "Mejoramiento nutricional de legumbres de consumo habitual fermentadas por cultivos del género *Lactobacillus*". *Alimentos*, 16(2) (1991).
- ♦ Cantarelli C., Brenna O., Giovanelli G. y Rossi M. "Beverage stabilization through enzymic removal of phenolics". *Food Biotechnology*, 3:203-213 (1989).
- ♦ Cascales M. "Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad. Ediciones Instituto de España, Madrid (1999).
- ♦ Castillo E.M., de Lumen B.O., Reyes P.S. y de Lumen H.Z. "Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 351-355 (1990).
- ♦ Chae S.K. y Yu T.J. "Experimental manufacture of acorn wine by fungal tannase". *Hanguk Sipkum Kwahakhoechi*, 15:326-332 (1983).

- **Champ M.** "Benefits of pulses in human diet". 4th European Conference on Grain Legumes. Cracovia, Polonia (2001).
- **Chatterjee S.N. y Agarwal S.** "Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation". *Free rad. Biol. Med.* 4:51-72 (1988).
- **Chavan U.D., Chavan J.K. y Kadam S.S.** "Effect of fermentation on soluble proteins and in vitro protein digestibility of sorghum, green gram and sorghum-green gram blends". *Journal of Food Science*, 53(5):1574-1575 (1988).
- **Cerdan S., Hansen C.A., Johanson R., Inobushi T. y Williamson J.R.** "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of myo-Inositol Phosphates including Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate". *J. Biol. Chemistry* 261:1476-1480 (1986).
- **Cheyran M.** "Phytic acid interactions in food systems". *CRC Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 13:297-335 (1980).
- **Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F. y Chou S.T.** "Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extracts from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1". *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2454-2458 (2002).
- **Classen H.L., Balnave D. y Bedford M.R.** "Reduction of legume antinutritional factors using biotechnological techniques". En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. Proceedings of the first International workshop on antinutritional factors in legumes seeds.* J. Huisman, van der Poel T.F.B. y Liener I.E. (Eds), November 23-25, Wageningen, The Netherlands (1988).

- Cosgrove D.J. "Inositol Phosphates: Their chemistry, biochemistry and physiology". New York: Elsevier Scientific Publishing Company (1980).
- Cranwell K y Liebman M. "Effect of soybean fiber and phytate on serum zinc response". *Nutr. Res.*, 9:127-132 (1989).
- Crean D.E.C. y Haisman D.R. "The interaction between phytic acid and divalent cations during the cooking of dried peas" *Journal Science Food Agriculture* 14:824-833 (1963).
- Cruz R. y Park Y.K. "Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk". *Journal of Food Science* 47:1973-1975 (1982).
- Cruz R., Batistela J.C. y Wosiacki G. "Microbial α -galactosidase for soymilk processing". *Journal of Food Science* 46:1196-1200 (1981).
- Czarnecka M., Czarnecki Z., Nowak J. y Roszyk H. "Effect of lactic fermentation and extrusion of bean and pea seeds on nutritional and functional properties". *Nahrung*, 42:7-11 (1988).
- Dahlqvist A. "Method for assay of intestinal disaccharides". *Anal. Biochem.*, 7:18 (1964)
- Davey M.W., Montagu M.V., Inzé D., Sanmartín M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzoe I.J.J., Strain J.J., Farrell D. y Fletcher J. "Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing". *J. Sci. Food Agric.* 80:825-860 (2000).
- De Haro A. "La calidad nutritiva de las leguminosas grano y su control genético en "Leguminosas Grano"", editado por J.Y. Cubero y M.T. Moreno. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España (1983).

- Della Gatta C., Piergiovanni A.R. y Perrino P. "An improved method for the determination of trypsin inhibitor levels in legumes". *Lebensm. Wiss u Technol.*, 21:315-318 (1988).
- Denter J. y Bisping B. *Int. J. Food Microbiol.* 22:23-31 (1994).
- Denter J., Rehm H-J, Bisping B. "Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation". *International Journal of Food Microbiology*, 45:129-134 (1998).
- Deshpande S.S. "Food legumes in human nutrition: A personal perspective". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (4): 333-363 (1992).
- Deshpande S.S., Salunkhe D.K., Oyewole O.B., Azam-Ali S., Battcock M., Bressani R. *Fermented grain legumes, seeds and nuts. A global perspective.* FAO, Rome, Italy (2000).
- Dey P.M. "Oligosaccharides". En: *Methods in Plant Biochemistry*, vol.2, Carbohydrates pp 189-218. Dey P.M. y Harborne J.B. (Eds). London, Academy Press(1990).
- Dey P.M. y Pridham J. "Biochemistry of galactosidases". *Advanced of Enzymology* 36, 91-130 (1972).
- Dey P.M. y Del Campillo E. "Biochemistry of the multiple forms of glycosidase in plants". *Advanced Enzymology* 56:141-249 (1984a).
- Dey P.M., Del Campillo E.M. y Pont R. "Characterization of a glycoprotein α -galactosidase from lentil seed (*Lens culinaris*)". *The Journal of Biological Chemistry* 258(2), pp. 923-929 (1983).

- ♦ Dey P.M., Del Campillo E. y Lezica R.P. The Journal of Biological Chemistry (1984b)
- ♦ Diplock A.T. "Antioxidants and disease prevention". Molecular Aspects of Medicine, 15, 293 (1994).
- ♦ Diplock A.T., Agget P., Ashwell M., Bornet F., Dance B., Fern E.B. y Roberfroid M.B. "Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus and document". British Journal of Nutrition, 81 suppl. 1, S1-S27 (1999).
- ♦ Doughty J. y Walker A. Etude FAO: Alimentation et Nutrition. FAO, Roma, Italia (1982).
- ♦ Dueñas M. "Compuestos bioactivos en legumbres. Evaluación y efecto del procesote adición de enzimas". Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid (2003).
- ♦ Dueñas M., Fernández D., Hernández T., Estrella I. y Muñoz R. "Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.) modifications by fermetation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC-14917". J. Sci. Food Agric. (2004) (Aceptado).
- ♦ Duszkievicz-Reinhard W., Gujska E. y Khan K. "Reduction of stachyose in legume flours by lactic acid bacteria". J. Food Sci. 59:115-117 (1994).
- ♦ Egounlety M. y Aworth O.C. "Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glyine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms)". Journal of Food Engineering 56:249-254 (2003).

- ♦ Eitenmiller R.R. y Landen W.O. "Vitamin analysis for the health and food sciences". New York, CRC Press (1999).
- ♦ El-Adawy T.A., Rahma E.H., El-Bedawy A.A. y Sobihah T.Y. "Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds". *Nahrung* 44(5):S39-S343 (2000).
- ♦ El-Difrawi E.A., Hudson B.J.F. "Identification and Estimation of Carotenoids in the Seeds of Four Lupinus Species". *J. Sci. Food Agric.* 30, 1168-1170 (1979)
- ♦ El-Madhy A., Moharram Y.G. y Abou-Samaha O.R. "Influence of germination on the nutritional quality of lentil seeds". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 181:318-320 (1985).
- ♦ Esaki H., Onozaki H. y Osawa, T. "Antioxidative activity of fermented soybean products". In: *Food Phytochemicals for Cancer Prevention* I. Huang M.T., Osawa T., Ho C.T., Rosen R.T. Eds. ACS Symposium Series 546. American Chemical Society, Washington DC (1994).
- ♦ FAO Food Balance Sheets, FAOSTAT database collections (1982).
- ♦ FAO Food Balance Sheets, FAOSTAT database collections (1996).
- ♦ FAO Food Balance Sheets, FAOSTAT database collections (2001).
- ♦ Fernández-Orozco R., Zielinski H., Frías J., Vidal-Valverde C. y Piskula M. K. "Superoxide dismutase-like activity of raw, cooked and germinated lentils". *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* vol. 11/52, SI 2, pp. 39-44 (2002).

- ♦ Fernández-Orozco R., Zielinski H. y Piskula M. K. "Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds". *Nahrung/Food*, 47, 291-299 (2003).
- ♦ Fonseca M.F. y Bora P.S. "Composición química y análisis de aminoácidos de alubias". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2 (5), 248-252 (2000).
- ♦ Ford J.R., Mustakas G.C. y Schumutz R.D. *Journal American Oil Chemistry Society*, 55:371-374 (1978).
- ♦ Fredrikson M., Alming M.L., Carlsson N.G. y Sandberg A.S. "Phytate content and phytate degradation by endogenous phytase in pea (*Pisum sativum*)". *J. Sci. Food Agric.* 81:1139-1144 (2001).
- ♦ Frías J. "Eliminación de alfa-galactósidos en lentejas (*Lens culinaris*) mediante procesado. Efecto en el contenido en almidón y fibra alimentaria". Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España, Tesis Doctoral (1992).
- ♦ Frías J., Bakhsh A., Jones D., Arthur A.E., Vidal-Valverde C., Rhodes M.J.C. y Hedley C.L. "Genetic analysis of the raffinose oligosaccharide pathway in lentil seeds". *Journal of Experimental Botany* 50(333):469-476 (1999).
- ♦ Frías F., Hedley C.L., Price K.R. Fenwick G.R. y Vidal-Valverde C. "Improved methods of oligosaccharide analysis for genetic studies of legume seeds". *Journal of Liquid Chromatography* 17, 2469-2483 (1994a).
- ♦ Frías F., Price K.R. Fenwick G.R., Hedley C.L., Sorensen H. y Vidal-Valverde C. "Improved method for the analysis of α -galactosides in pea seeds by capillary zone electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography-tiple-pulsed amperimetric detection". *Journal of Chromatography A* 719, 213-219 (1996a).

- Frías F., Vidal-Valverde C., Sotomayor C., Díaz-Pollán C. y Urbano G. "Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpea" *European Food Research and Technology* 210: 340-345 (2000).
- Frías J., Díaz-Pollán C., Hedley C.L. y Vidal-Valverde C. "Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2231-2234 (1995).
- Frías J., Díaz-Pollán C., Hedley C.L. y Vidal-Valverde C. "Evolution and kinetics of monosaccharides, disaccharides and α -galactosides during germination of lentils". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 202:35-39 (1996b).
- Frías J., Fornal J., Ring S.G. y Vidal-Valverde C. "Effect of germination on physico-chemical properties of gentil starch and its components". *Food Struct.*, 13 (1996c)
- Frías J., Kóvacs E., Sotomayor C., Hedley C., Vidal-Valverde C. "Processing peas for producing macarroni". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 204:66 (1997).
- Frías J., Miranda-Zárate M.L. y Vidal-Valverde C. "Effect of germination and fermentation in the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa". *Food Chem.*, 2004 (aceptado).
- Frías J., Vidal-Valverde C., Bakhsh A., Arthur A.E. y Hedley C.L. "An assessment of variation for nutritional and non-nutritional carbohydrates in lentil seeds (*Lens culinaris*)". *Plant Breeding* 113, 170-173 (1994b).
- Frías J., Vidal-Valverde C., Kozłowska H., Górecki R., Honke J. Y Hedley C.L. "Evolution of carbohydrates during the development of pea, faba

- pea and lupin seeds". Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung 203, 27-32 (1996d).
- ♦ Frías J., Vidal-Valverde C., Kozłowska H., Tabera T., Honke J. Y Hedley C.L. "Natural fermentation of lentils Influence of time, flour concentration and temperature on the kinetics of monosaccharides, disaccharide and alpha-galactosides". Journal of Agriculture and Food Chemistry 44, 579-584 (1996e).
 - ♦ Garewal H.S. "Antioxidants and disease prevention". Ediciones CRC Press, Boca Ratón, Florida (1997).
 - ♦ Gatel F. y Champ M. "Grain Legumes in human and animal nutrition-up to date results and question marks". 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid, España (1998).
 - ♦ Geervani P. y Theophilus F." Effect of home on the protein quality of selected legumes". Journal of Food Science, 45:707-710 (1980).
 - ♦ Ghorpade U.M. y Kadam S.S. "Germination". En: CRC Handbook of World Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization; Salunkhe D.K. y Kadam S.S. (Eds),CRC press: Boca Ratón, FL, vol.3,pp 165-206 (1989).
 - ♦ Gibbs P.A. Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl. 16:51S-58S (1987).
 - ♦ Gontzea I. y Sutzescu P. "Natural antinutritive substances in foodstuffs and forages, S.Karger,Basel (1968).
 - ♦ Gosselin R.E. y Coghlan E.R. "the stability of complexes between calcium and orthophosphate, polimeric phosphate and phytate". Arch. Biochemistry Biophysic, 45:301 (1953)

- ♦ **Guillon F. y Champ M.** "Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health". *British Journal of Nutrition*, 88, Suppl.3, S293-S306 (2002)
- ♦ **Granito M. Frías J., Doblado R. Guerra M., Champ M. y Vidal-Valverde C.** "Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation". *European Food Research and Technology* 214:226-231 (2002).
- ♦ **Green G.M. y Lyman R.L.** "Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for the trypsin-induced hypersecretion in rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140:6-12 (1972).
- ♦ **Greiner R. y Konietzny U.** "Phytate hydrolysis in black beans by endogenous and exogenous enzymes". In: *Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. COST 98*, vol. 4, pp. 19-27 (1996).
- ♦ **Gustafsson E-L. y Sandberg A-S.** "Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.)". *J. Food Science* 60(1):149-152 (1995).
- ♦ **Habiba R.A.** "Changes in antinutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods". *Food Chemistry*, 77:187-192 (2002).
- ♦ **Haworth R.D., Jones K. y Rogers H.J.** "Ion-exchange chromatography of *Aspergillus niger* extract". *Proc. Chemical Society* 8-9 (1958).
- ♦ **Hedley C.** "Introduction". En *Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic characteristics*. C.L. Hedley (eds) CABI publishing (2001).

- ♦ Hegeman C.E. y Grabau E.A. "A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatase is expressed in cotyledons of germinating soybean seedling". *Plant Physiology*, 126:1598-1608 (2001).
- ♦ Henshaw F.O., McWatters K.H., Akingbala J.O. y Chinnan M.S. "Thermal properties of cowpea flour: A study by differential scanning calorimetry". *Nahrung* 47(3):161-165 (2003).
- ♦ Hernández T. "Contenido en polifenoles totales de judías *Vigna sinensis* var. Carilla". Comunicación personal 2004.
- ♦ Hesseltine C.W. "Mixed-Culture Fermentations: An introduction to oriental food fermentations". En: *Mixed Cultures in Biotechnology*. J. Gregory Zeikus and Eric A. Johnson (eds.) McGraw-Hill, Inc., New York (1991).
- ♦ Hicks R.M. "The scientific basis for regarding vitamin A and its analogues as anti-carcinogenic agents". *Proc. Nutr. Soc.*, 42:83-93 (1983).
- ♦ Hissin J.P. y Hilf R. "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". *Anal. Biochem.*, 74, 214-226 (1976).
- ♦ Honke J., Kozłowska H., Vidal-Valverde C., Frías J. Y Górecki R. "Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 206:279-283 (1998).
- ♦ Hoppe M.B., Jha H.C. y Egge H. "Structure of an antioxidant from fermented soybeans (Tempeh)". *J. Am. Off. Chem. Soc.*, 74, 477-479 (1997).
- ♦ Hughes J.S. "Potential contribution of dry bean dietary fiber to health". En: *Overview outstanding symposia in food science and technology*. Food Technology, september (1991).

- ♦ Huisman J. y Tolman G. "Recent advances in animal nutrition". Butterworth-Heinemann (1992).
- ♦ Hung N.D., Cseke E., Vas M. y Szabolsci G. J. Food Sci. 49:1543-1547 (1984).
- ♦ Hybenová E., Drdák M., Guoth R. y Gracák J. "Utilisation of nitrates- a decisive criterion in the selection of *Lactobacilli* for bioconservation of vegetables". Z. Lebensm. Unters Forsch 200:213-216 (1995).
- ♦ Ibrahim S.S., Habiba R.A., Shatta A.A. y Embaby H.E. "Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas". Nahrung 46(2), pp 92-95 (2002).
- ♦ Iqbal T.H., Lewis K.O. y Cooper B.T. "Phytase activity in the human and rat small intestine". Gut., 35:1233-1236 (1994).
- ♦ Irving G.C.J. "Phytase". In: Inositol Phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology, Cosgrove D.J. e Irving G.C.J. (Eds), Elsevier Sci. Publ. Co, Amsterdam, The Netherlands, p. 85 (1980).
- ♦ Irvine R.F. y Moor R.M. "Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent of external Ca^{2+} ". Biochem. J., 240:917-920 (1986).
- ♦ James J. y Simpson B.K. Application of enzymes in food procesing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36(5):437-463 (1996).
- ♦ Jansmann A.J.M. "Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals". Nutrition Res. Rev. 6:209-236 (1993).

- ♦ Jean D., Pourrat H. y Pourrat A. "Culture d'un souche d'*Aspergillus niger* productrice de tannase (tannin acyl hydrolase). Application B la dégradation de tannins galliques". Bull. Liaison Groupe Polyphenols 8:134-141 (1978).
- ♦ Johnson F.C. "The antioxidant vitamins". Ctrical review Food Science and Nutrition, 11:217-309 (1979).
- ♦ Johnson I.T., Gee J.M., Price K., Curl C. y Fenwick G.R. "Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vivo". Journal of Nutrition, 116:2270-2277 (1986).
- ♦ Jones D.A., Barber L.M., Hedley C.L. "What is the potencial for pea as an alternative oilseed crop". 2nd European Conference on Grain Legumes. Copenhage, Dinamarca (1995).
- ♦ Jones D.A., Barber L.M., Johnson S., Macleod M., Wang T. Y Hedley C.L. "Genectic analysis of the storage lipid biosynthesis pathway in pea (*Pisum sativum*) seeds". 1st European Conference on Grain Legumes. Angers, Francia (1992).
- ♦ Jones D.P., Coates R.J., Flagg E.W., Eley J.W., Block G., Greengerg R.S., Gunter E.W. y Jackson B. "Glutathione in Foods listed in the National Cancer Intitute's Health Habits and History Food Frequency Questionnarie". Nutrition and Cancer 17(1):57-75 (1992).
- ♦ Jood S., Mehta U. y Singh R. "Effect of proccesing on available carbohydrates in legumes". J. Agric. Food Chem. 34:417-422 (1986).
- ♦ Kadlec P., Bjerregaard C., Gulewicz K., Horbowicz M., Jones A., Kintia P., Kratchanov C., Kratchanova M., Lewandowicz G., Soral-Smietana M., Sorensen H. y Urban J. "Carbohydrate chemistry". En

- Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic characteristics. C.L. Hedley (eds) CABI publishing (2001).
- ♦ **Kakade M.L., Rackis J.J., McGhee J.E. and Puski G.** "Determination of thypsin inhibitor activity of soybean products: a collaborative analysis of an improved procedure". *Cereal Chem.* 51, 376-382 (1974).
 - ♦ **Kantha S.S. y Erdman J.W.** "Legume carotenoids". *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 26(2) (1987).
 - ♦ **Kazanas N. y Fields M.L.** *Journal of Food Science* 46:819-821 (1981).
 - ♦ **Keuth S. y Bisping B. J.** *Appl. Bacteriol.* 75:427-434 (1993).
 - ♦ **Khalil A.H. y El-Adawy T.A.** "Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes". *Food Chemistry*, 50:197-201 (1994).
 - ♦ **Khan M.A., Jacobsen I., Euggum B.O.** "Nutritive value of some improved varieties of legumes". *Journal Science Food Agriculture*, 30:395 (1979).
 - ♦ **Khare S.K., Jha K., Gandhi A.P. y Gupta M.N.** "Hydrolysis of flatulence-causing galactooligosaccharides by agarose-entrapped *Aspergillus oryzae* cells". *Food Chemistry* 51:29-31 (1994).
 - ♦ **Kiiskinen T y Piironen J.** "Effect of phytase supplementation on utilization of phosphorous in chicken diets". In: *Proceedings of 8th European Poultry Conference*, pp. 376-380, World Poultry Science Association, Barcelona, España (1990).
 - ♦ **Kmita-Glazewska H. y Kostyra H.** "Chemical composition of soluble and insoluble fractions of dietary fibre isolated from pea seeds". En: *AEP (ed.) Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value crops to Meet*

- European Demands. Proceedings of 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid. AEP, Paris, p. 382 (1998).
- ♦ Koga T. y Terao J. "Antioxidant behaviors of vitamin E analogues in unilamellar vesicles". *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(6):1043-145 (1996).
 - ♦ Koide T., Tsunasawa S. e Ikenaka T. *Eur. J. Biochem.*, 32:408-416 (1973). En: Toxic constituents of plant foodstuffs. Irvin E. Liener (ed.), Academic Press, 1980.
 - ♦ Konietzny U. y Greiner R. "Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases)". *International journal of Food Science and technology*, 37:791-812 (2002).
 - ♦ Kozłowska H., Honke J. y Sadowska J. "Natural fermentation of lentils: Influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis of inositol phosphates". *Journal Science and Food Agriculture* 71, 367-375 (1996).
 - ♦ Kozłowska H., Zdunczyk Z. y Honke J. "Legume grains for food and non food uses". 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid, España (1998).
 - ♦ Kozłowska H., Aranda P., Frías J., López-Jurado M., Pokorny J., Urbano G., Vidal-Valverde C. Y Zdunczyk Z. "Nutrition". En *Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic characteristics*. C.L. Hedley (eds) CABI publishing (2001).
 - ♦ Kunitz M.,: "Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean", *Science*, 101, 668 (1945).
 - ♦ Laguna M.R., Ramos A., González R., Caminero C., Martín J.A. "El cultivo del guisante proteaginoso". *Agricultura*, 777:135 (1997)

- ♦ **Larralde J.** "Las legumbres en la alimentación". En Alimentos y salud, monografía VI. B. S. Pérez (Eds.). Instituto de España. Real Academia de Farmacia (2000).
- ♦ **Lehrfeld J.** "HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions". J. Agric. Food Chem. 42:2726-2731 (1994).
- ♦ **Leterme P. y Muñoz C.** "Factors influencing pulse consumption in Latin America". British Journal of Nutrition 88(1):S251-S254 (2002).
- ♦ **Li B.W., Schuhmann P.J. y Wolf W.R.** "Chromatographic determinations of sugars and starch in a diet composite reference material". J. Agric. Food Chem., 33, 531-536 (1985)
- ♦ **Liener I.E.** "Legume toxins in relation to protein digestibility: a review". J. Food Sci., 41, 1076 (1976).
- ♦ **Liener I.E.** "Toxic constituents of plant foodstuffs". Food Science and Technology, a series of monographs (2nd ed.) Liener I.E. Academy Press, N.Y. USA (1980).
- ♦ **Liener I.E. y Kakade M.L.** "Protease inhibitors". En: Toxic constituents of plant foodstuffs (2nd ed.) Liener I.E. Academy Press, N.Y. USA, 7-71 (1980).
- ♦ **Lin C.C., Wu S.J., Wang J.S., Yang J.J. y Chang C.H.** "Evaluation of the antioxidant activity of legumes". Pharmaceutical Biol., 39, 300-304 (2001).
- ♦ **Lindsay D.G. and Astley S.B.** European Research on the Functional Effects of Dietary Antioxidants-EUROFEDA. Molecular Aspects of Medicine vol.23, pp 1-38 (2002).

- ♦ **Loewus F.A. y Murthy P.P.N.** "myo-Inositol metabolism in plants". *Plant Sci.* 150:1-19 (2000).
- ♦ **Lönnerdal B., Sandberg A., Sandström B. y Kunz C.** "Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats". *Journal of Nutrition*, 119:211-214 (1989).
- ♦ **Lott J.N.A. y Ockenden I.** "The fine structure of phytate-rich particles in plants". En: *Phytic acid: Chemistry and Applications* (Graf E, ed.), Minneapolis, MN: Pilatus Press, 43-55 (1986).
- ♦ **Machlin, L. J.** "Handbook of vitamins. Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects" Machlin, L.J. Eds. Marcel Dekker, New York (1995).
- ♦ **Madhavi D.L., Deshpande S.S. y Salunkhe D.K.** "Food antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives". New York: Marcel Dekker, Inc. (1996).
- ♦ **Mansour E.H. y Khalil A.H.** "Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer arietinum*) flour by crude extracellular fungal α -galactosidase". *Journal Science and Food Agriculture* 78, 175-181 (1998).
- ♦ **Marconi E., Ruggeri S. y Carnovale E.** "Chemical evaluation of wild under-exploited *Vigna* spp. seeds". *Food Chemistry* 59(2):203-212 (1997).
- ♦ **Márquez M.C. y Alonso R.** "Inactivation of trypsin inhibitor in chickpea". *Journal of Food Composition and Analysis* 12, 211-217 (1999).
- ♦ **Márquez M.C., Fernández V. y Alonso R.** "Effect of dry heat on the *in vitro* digestibility and trypsin inhibitor activity of chickpea flour". *Journal of Food Science and Technology* 33, 527-532 (1998).

- ♦ **Martínez C., Ros G., Periago M.J., López G, Ortuño J. y Rincón F.** “El ácido fítico en la alimentación humana”. *Food Science and Technology International*, 2. 201-209 (1996).
- ♦ **Martín-Cabrejas M.A., Sanfiz B., Vidal A., Mollá E., Esteban R. y López-Andréu F.J.** “Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.)”. *J. Agric. Food Chem.* 52:261-266 (2004).
- ♦ **Martín-Hernández D y Cámara M.M.** “Alimentos funcionales”. En: *Alimentos y salud, monografía VI.* B. S. Pérez (Eds.). Instituto de España. Real Academia de Farmacia (2000).
- ♦ **Martínez J.A. y Zulet M.A.** “Leguminosas. Alimentos: Composición y propiedades”. *Mc Graw Hill, Interamericana de España, S.A.U.*, 155-167 (1999).
- ♦ **Matsou M.** “In vivo antioxidant activity of okara koji, a fermented okara, by *Aspergillus oryzae*”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1968-1972 (1997).
- ♦ **Meister A.** “Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; application in research and therapy”. *Pharmacol. Ther.* 51:155 (1991).
- ♦ **Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V. y Milner A.A.** “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates”. *Clin. Sci.*, 84, 407-412 (1993).
- ♦ **Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1984).** (Web: mapya.es)
- ♦ **Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2002).** (Web: mapya.es)

- ♦ Mitchell D.B., Vogel K., Weimann B.J., Pasamontes L. y van Loon A.P.G.M. "The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*". Microbiology 143:245-252 (1997).
- ♦ Mittal Y. y Sharma C.B. Plant Science 77:185-190 (1991).
- ♦ Monma M., Terao J., Ito M., Saito M., Chikuni K. "Carotenoid Components in Soybean seeds Varying with Seed Color and Maturation Stage". Biosci. Biotech. Biochem. 58, 5, 926-930 (1994).
- ♦ Montgomery R.D. "Cyanogens". En: Toxic constituents of plant foodstuffs (2nd ed.) Liener I.E. Academy Press, N.Y. USA, 7-71 (1980).
- ♦ Muck R.E. "Silage fermentation" En: Mixed cultures in biotechnology, chapt. 7. J. gregory Zeikus and Erik A. Johnson (Eds.). McGraw-Hill, Inc., New York (1991).
- ♦ Mulimani V.H., Thippeswamy S. y Ramalingam. "Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of soybean flour". Food Chemistry 59, 279-282 (1997).
- ♦ Murakami H., Asakawa T., Terao J., Matsushita S. "Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation". Agric. Biol. Chem., 48, 2971-2975 (1984).
- ♦ Nakano T., Joh T., Narita K. y Hatakawa T. "The Pathway of Dephosphorilation of myo-Inositol Hexakisphosphate by Phytases from Wheat Bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin # 61". Bios. Biotechnol. Biochem. 64:995-1003 (2000).
- ♦ Niki E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". Chem. Phys. Lipids 44:227-253 (1987).

- ♦ Nout M.J.R., Rombouts F.M. y Havelaar A. "Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients of some pathogenic microorganisms". *Int. J. Food Microbiol.* 8:351-361 (1989).
- ♦ Odani S. e Ikenaka T. *J. Biochem (Tokyo)*, 74:697-715 y 857-869 (1973 a, b). En: Toxic constituents of plant foodstuffs. Irvin E. Liener (ed.), Academic Press, 1980.
- ♦ O'dell B.L. y De Boland A. "Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseeds meals". *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 24:804-808 (1976).
- ♦ Ohkawa T., Ebisuno S., Kitagawa M., Marimoto S., Miyazaki Y. y Yasukawa S. "Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies". *Journal of Urology* 132:1140-1145 (1984).
- ♦ Olson A.C., Gray G.M., Gumbmann M.R. y Wagner J. "Nutrient composition of digestive response to whole and extracted dry beans". *Journal Agriculture and Food Chemistry* 30, 26-32 (1982).
- ♦ Onyenekwe P.C., Njoku G.C. y Ameh D.A. "Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides". *Nutrition Research* 20(3):349-358 (2000).
- ♦ Packer L. y Fuchs J. "Vitamin E in health and disease". Marcel dekker, New York, chap. I (1993).
- ♦ Pahl H. "Potential and constraints in production and end-uses of grain legumes in Europe-Grain legumes and economics". 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid (1998).

- ♦ **Pallauf V.J., Hohler D. Y Rinbach G.** "Effect of supplementation of microbial phytase in soybean diet in the absorption of Mg, Fe, Cu, Mn, Ca y Zn". *Journal Anim. Physiology Anim. Nutrition* 68:1-9 (1992).
- ♦ **Paredes-López O. y Harry G.** "Food Biotechnology review: Traditional solid state fermentations of plant raw materials-Application, nutritional significance and future prospects". *Critical Review Food Science and Nutrition*, 27:159 (1988).
- ♦ **Partearroyo M.A., Fernández-Quintela A. y Cid C.** "Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana". *Alimentaria*, noviembre pp. 115-120 (1995).
- ♦ **Pearson D.** "The chemical analysis of foods". En: *Sugar and preserves*, Chapter 4. Churchill Livingstone (Eds), London (1975).
- ♦ **Pellegrini N., Visioli F., Buratti S. y Brighenti F.** "Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating". *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2532-2538 (2001).
- ♦ **Pérez-Gálvez A. y Mínguez-Mosquera M. I.** "Structure-Reactivity Relationship in the Oxidation of Carotenoid Pigments of Pepper (*Capsicum annuum* L)". *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4864-4869 (2001).
- ♦ **Periago M.J., Martínez M.C., Ros G., López G., Ortuño J., Rodrigo J. y Rincón F.** "Influencia del inhibidor de la tripsina y del ácido fítico sobre la digestibilidad in vitro de la proteína en elgumbres de la dieta mediterránea". *Alimentaria*, 113-117 (1997).
- ♦ **Phillippy B.Q.** "Identification by two-dimensional NRM of myo-Inositol tris- and tetrakis (phosphates) formed from phytic acid by wheat phytase". *J. Agric. Food Chem.*, 37:1261-1265 (1989).

- ♦ **Phillips R.D. y McWatters K.H.** "Contribution of cowpeas to nutrition and health". En: Overview outstanding symposia in food science and technology. Food Technology, september (1991).
- ♦ **Plaza L., De Ancos B. y Cano P.** "Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method". European Food Research and Technology, 216:138-144 (2003)
- ♦ **Pokorny P., Yanisshlieva N. y Gordon M.** "Antioxidants in food. Practical applications". Editorial Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England (2001).
- ♦ **Porres J.M., Aranda P., López-Jurado M. y Urbano G.** "Effect of natural and controlled fermentation on chemical composition and nutrient dialyzability from beans (*Phaseolus vulgaris*)". J. Agric. Food Chem. 51:5144-5149 (2003).
- ♦ **Porter J.E., Sarikaya A., Herrmann K.M. y Ladisch M.R.** "Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase". Enzyme Microbiology and Technology 14 (1992).
- ♦ **Pourrat H., Regerat F., Pourat A. y Jean D.** "Production of acid gallic from tara tannin by a strain of *Aspergillus niger*". Journal Ferment. Technology, 63:401-403 (1985).
- ♦ **Preston K. y Kruger J.** "Location and activity of proteolytic enzymes in developing wheat kernels". Can. J. Plan. Sci., 56:217-223 (1976).
- ♦ **Price K.R., Lewis J., Wytatt G.M. y Fenwick G.R.** "Review article, Flatulence-Causes, relation to diet and remedies". Die Nahrung 6, 609-626 (1988).

- Pridham J.B. y Dey P.M. In: "Plant Carbohydrate Chemistry". J.B. Pridham (Ed), Academic Press, pp.83-96, London and New York (1974).
- Prinyawiwatkul W., McWatters K.H., Beuchat L.R. y Dixon Phillips R. "Cowpea Flour: A potential ingredient in food products". Critical Reviews in Food Science and nutrition, 36(5):413-416 (1996).
- Prodanov M. "Optimización de distintos procesos tecnológicos para la obtención de concentrados de leguminosas con elevado contenido en tiamina, riboflavina y niacina". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid (1996).
- Prodanov M., Sierra I. y Vidal-Valverde C. "Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes". Food Chemistry 84:271-277 (2004).
- Pusztai A. "Plant lectins-biological functions". Acta Biochimica et Biophysica Hungarica, 22: 355-375 (1987).
- Quemener B., Brillouet J.M. "Ciceritol, a pinitol digalactosidase from seeds of chickpea, lentil and white lupin". Phytochemistry 22:1745-1751 (1983).
- Quesada C., Bartolomé B., Nieto O., Gómez-Cordovés C., Hernández T., Estrella I. "Phenolic inhibitors of α -amilase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils and cocoa". J. Food protection, 59:185-192 (1995).
- Raboy V. "Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexakisphosphate". Phytochemistry, 64:1033-1043 (2003).
- Rackis J.J. "Oligosaccharides of food legumes: Alpha-galactosidase activity and the flatus problem". En: Physiological effects of food carbohydrates.

- Jeanes A. y Hodge J. (Eds) American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp 207-222 (1975).
- ♦ **Ragaei S.M., El-Banna A.A., Damir A.A., Mesallam A.S. y Mohamed M.S.** "Effect of natural lactic acid fermentation on amino acids content and in-vitro digestibility of lentils". *Alex. Sci. Exch.*, 7(2):217-224 (1986).
 - ♦ **Ramos A.** "El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León". Fernando Franco y Álvaro Ramos (Eds.). Junta de Castilla y León (1996).
 - ♦ **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C.** "Antioxidant activity and improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1231-1237 (1999).
 - ♦ **Reddy N.R. y Salunkhe D.K.** "Fermentation". En: *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization, Volume III*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida (1989a).
 - ♦ **Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K. y Salunkhe D.K.**: *Phytates in Cereals and Legumes*, Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc (1989b)
 - ♦ **Reddy N.R., Sathe S.K.**: *Food Phytates*, Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc (2002).
 - ♦ **Reddy N.R., Sathe S.K. y Salunkhe D.K.**: "Phytates in Legumes and Cereals". *Advances Food Research*, 28:1-92 (1982).
 - ♦ **Reichard S.M., Bailey N.M. y Galván M.J.** "Alterations in tissue glutathione levels following trauma shock". *Adv. Shock Res.* 5:37 (1981).
 - ♦ **Rijke de D.** "EU regulation on feed enzymes. A perspective from an enzyme manufacturer". En: *2nd Symposium on Feed Enzymes*, Noordwijkerhout, Netherlands (1995).

- ♦ **Rodríguez-Bürguer A.P., Mason A. y Nielsen S.S.** "Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food". *J. Agric. Food Chem.* 46:4806-4813 (1998).
- ♦ **Salunkhe D.K. y Kadam S.S.** *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization.* CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida (1989).
- ♦ **Shamsuddin A.M.** "Anti-cancer function of phytic acid". *International J. Food Sci. Technol.* 37:769-782 (2002).
- ♦ **Sandberg A.S. y Andlid T.** "Phytogenic and microbial phytases in human nutrition". *International Journal of Food Science and Technology*, 37:823-833 (2002).
- ♦ **Sandberg A.S., Brune M., Carlsson N.G., Hallberg L., Skoglund E. y Rossander-Hulthén L.** "Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans". *American Journal Clinical Nutrition* 70:240-246 (1999).
- ♦ **Savage G.P.** "The composition and nutritive value of lentils (*Lens culinaris*)". *Nutrition Abstracts and Reviews (series A)* 5 (1988).
- ♦ **Scott J.J.** "Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legum seeds". *Plant Physiology*, 95:1298-1301 (1991).
- ♦ **Shamsuddin A.M.** "Anti-cancer function of phytic acid". *International Journal of Food Science and Technology*, 37:769-782 (2002).
- ♦ **Sheppard A.J., Pennington J.A.T. y Weihrauch J.L.** "Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods" In: *Vitamin E in Health and Disease*, Packer L y Fuchs J (Eds), Marcel-Dekker, New York, pp. 9-31 (1993).

- ♦ Sierra I., Prodanov M., Calvo M. y Vidal-Valverde C. "Vitamin stability and growth of psychotrophic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide". J. Food Prot., 59, 1305-1310 (1996).
- ♦ Sierra I. y Vidal-Valverde C. "Kinetics of free and glycosylated B₆ vitamers, thiamin and riboflavin during germination of pea seeds". J. Sci. Food Agric. 79:307-310 (1999).
- ♦ Siddhuraju P., Osonuyi O., Makkar H.P.S. y Becker K. "Effect of soaking and ionising radiation on various antinutritional factors of seeds from different species of an unconventional legume, *Sesbania* and a common legume, green gram (*Vigna radiata*)". Food Chemistry 79:273-281 (2002).
- ♦ Simon O. e Igbasan F. "In vitro properties of phytases from various microbial origins". Int. J. Food Sci. Technol. 37:813-822 (2002).
- ♦ Slomiski B.A. "Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of α -galactosidase and β -fructofuranosidase: Potencial for use as dietary additives". Journal Science and Food Agriculture 85:323-330 (1994).
- ♦ Smith I.K., Vierheller T.L. y Thorne C.A. "Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)". Anal. Biochem., 175, 408-413 (1988).
- ♦ Somiari R.I. y Balogh E. "Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours". Journal Science and Food Technology 61, 339-343 (1993).
- ♦ Somiari R.I. y Balogh E. "Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal". Enzyme and Microbial Technology 17:311-316 (1995).

- ♦ Sotomayor C. "Flour legumes obtained by technological procedures. Chemical and Biological evaluation of starch". Tesis Doctoral. Madrid (1997).
- ♦ Sotomayor C., Frías J., Fornal J., Sadowska J., Urbano G., Vidal-Valverde C. "Lentil starch content and its microscopical structure as influenced by natural fermentation". *Starch*, 51(5):152-156 (1999).
- ♦ Steinkraus K.H. "Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes". *Antonie van Leeuwenhoek*, 49:337-348 (1987).
- ♦ Stephens L.R. e Irvine R.F. "Stepwise phosphorylation of myo-inositol leading to myo-inositol hexakisphosphate in *Dictyostellium*". *Nature*, 346:580-583 (1990).
- ♦ Streicher E. "Acute renal failure and jaundice following rhubarb leaf poisoning". *Dtsch. Med. Wochenschr*, 89:2379-2381 (1964).
- ♦ Sugimoto H. y van Buren J.P. "Removal of oligosaccharides from soy milk by an enzyme from *Aspergillus satoi*". *Journal of Food Science* 35:655-660 (1970).
- ♦ Svanberg U. y Lorri W. "Fermentation and nutrient availability". *Food Control*, 8:319-327 (1997).
- ♦ Svanberg U., Lorri W. y Sandberg A.S. "Lactic fermentation of non-tannin and high tannin cereals: Effects of in vitro estimation of iron availability and phytate hydrolysis". *Journal of Food Science* 58:408-412 (1993).
- ♦ Tabera J., Frías J., Estrella I., Villa R. Y Vidal-Valverde C. "Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on

- protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 201:587-591 (1995).
- ♦ Tarelli E. "Inositol Monophosphates Prepared in a Single Step from myo-Inositol and Inorganic phosphate". *J. Carbohydr. Chem.* 19:233-341 (2000).
 - ♦ Terao J., Piskula M. y Yao Q. "Protective effects of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers". *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 278-284 (1994).
 - ♦ The Association of Microbial Food Enzyme Producers. "Regulatory aspects of microbial food enzymes" (1992).
 - ♦ Thebaudin J.Y., Lefebvre A.C., Harrington M. y Bourgeois C.M. "Dietary fibres: Nutritional and technology interest". *Trends in Food Science and Technology* 8:41-48 (1997).
 - ♦ Thompson L.U. "Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods". *Food Res. Int.*, 26:131-149 (1993).
 - ♦ Thompson C.O., Trener V.C. "A rapid method for the determination of total L-ascorbic acid in fruits and vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography". *Food Chem.*, 53, 43-50 (1995).
 - ♦ Torre M., Rodriguez A.R., Saura-Calixto F. "Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability". *Critical Review Food Science Nutrition*, 1:1-22 (1991).
 - ♦ Tournut J.R. "Feed additives enzymes in animal production-legislation". En: 2nd Symposium on Feed Enzymes, Noordwijkerhout, Netherlands (1995).

- ♦ Troszynska A. y Ciska, E. "Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity". Czech J. Food Sci., 20, 15-21 (2002).
- ♦ Troszynska A., Honke J., Waszczuk K. y Kozłowska H. "Oligosaccharide content in legume seeds and their changes during sterilization. En: AEP (ed.) Improving Production and Utilisation of Grain Legumes. Proceedings of the 2nd European Conference on Grain Legumes, AEP, Paris, p. 288 (1995).
- ♦ Trowell H. "Dietary fibre redefined". Lancet 1:967 (1976).
- ♦ Tsuda T., Makino Y., Kato H., Osawa T. y Kawakishi S. "Screening for antioxidative active of edible pulses". Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1606-1608 (1993).
- ♦ Türk M., Carlsson N.G. y Sandberg A.S. "Reduction in the levels of phytate during goléemela bread making: effect of yeast and wheat phytases". Journal of Cereal Science 23:257-264 (1996).
- ♦ Türk M., Sandberg A.S., Carlsson N.G. y Andlid T. "Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products". J. Agric. Food Chem. 48:100-104 (2000).
- ♦ Umeta M. y Faulks R.M. "The effects of Fermentation on the Carbohydrates in Tef (*Eragrostis tef*). Food Chemistry 27:181-189 (1988).
- ♦ Urbano G., Aranda P., Gómez-Villaba E., Frejnagel S., Porres J.M., Frías J., López-Jurado M. y Vidal-Valverde C. "Nutricional protein evaluation of functional pea (*Pisum sativum* L.) flours obtained alter enzymatic treatments". J. Agric. Food Chem. 2004 (enviado).
- ♦ Urbano G., Aranda P., Gómez-Villaba E., Frejnagel S., Porres J.M., Frías J., Vidal-Valverde C y López-Jurado M. "Nutricional evaluation of

- pea (*Pisum sativum* L.) Protein Diets alter Mild hidrothermal Treatment and with and without Added Phytase". J. Agric. Food Chem. 51(8):2415-2420 (2003).
- Urbano G., López-Jurado M., Hernández J., Fernández M., Moreu M.C., Frías J., Díaz-Pollán C., Prodanov M., y Vidal-Valverde C. "Nutritional assessment of raw, heated and germinated lentils". Journal of Agricultural Food Chemistry 43, 1871-1877 (1995).
 - Urjo A. y Puttaraj S. "Effect of processing on starch digestibility in some legumes-An in vitro study". Die Nahrung 38(1):38-46 (1994).
 - Valdebouze P. "Trypsin inhibiting and hemagglutinating activities in seeds of some legume species"" En: Protein quality from leguminous crops. Comisión de la C.E.E. Bruselas, pp. 87-98 (1980).
 - van der Riet W.B., Wight A.W., Cilliers J.J.L. y Datel J.M. "Food chemical analysis of tempeh prepared from South African-grown soybeans". Food Chemistry 25:197-206 (1987).
 - Vanderstoep J. "Effect of germination on the nutritive value of legumes". Food Technology 35:8385 (1981).
 - van Hartingsveldt W., Hessing M., van der Lugt J.P. y Somers W.A.C. Proceedings of the Second European Symposium on Feed Enzymes. Zeist, Netherlands (1995).
 - Van Lookeren Campagne C.J. y Kies A.K. "Developments in feed enzymes, enzyme activity, applications, efficacy and analyses". En: 2nd Symposium on Feed Enzymes, Noordwijkerhout, Netherlands (1995).
 - Vasconcellos A. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. The World of Food Science. Web:worldfoodscience.org (2000).

- ♦ Vidal-Valverde C., Frías F. y Esteban R.. "Dietary fibre in processed lentils". *Journal Food Science* 57, 1161-1163 (1992a).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías J., Sierra I., Blázquez I., Lambein F. y Kuo Y-H. "New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas". *European Food Research and Technology* 215:472-477 (2002).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías F. y Valverde S. "Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking". *Journal of American Dietetic Association* 93, 547-550 (1993a).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías F. y Valverde S. "Effect of processing on the soluble carbohydrate content of lentils". *Journal of Food Protection* 55, 301-304 (1992b).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías F., Prodanov M., Tabera J., Ruiz R. Y Bacon J. "Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity of lentils". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 197, 449-452 (1993b).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías F., Sotomayor C., Díaz-Pollán C., Fernández M. y Urbano G. "Nutrients and antinutritional factors in faba bean asaffected by processing". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 207, 140-145 (1998).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías J., Estrella I., Grospe M.J., Ruiz R. y Bacon J. "Effect of processing on some antinutritional factors of lentils". *Journal Agriculture and Food Chemistry* 42, 2291-2295 (1994).
- ♦ Vidal-Valverde C., Frías J., Hernández A., Martín-Álvarez P.J., Sierra I., Rodríguez C., Blázquez I. y Vicente G. "Assessment of nutricional

- compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds". J. Sci. Food Agric. 83:298-306 (2003).
- ♦ Vidal-Valverde C., Martin-Villa C., Olmedilla B. y Blanco I. "High performance liquid chromatography systems to separate and quantify a mixture of nine sugars and four polyols". J. Liquid Chromat. 8(1):75-94 (1985).
 - ♦ Vidal-Valverde C., Prodanov M. y Sierra I. "Natural fermentation of lentils. Influence of time, temperature and flour concentration on the kinetics of thiamin, riboflavin and niacin". Z. Lebensm. Unters Forsch A 205:464-469 (1997).
 - ♦ Vidal-Valverde C., Sierra I., Frías J., Prodanov M., Sotomayor C., Hedley C.L. y Urbano G. "Nutritional evaluation of lentils flours obtained after short-time soaking processes". European Food Research and Technology 214:220-226 (2002).
 - ♦ Vijayakumari K., Siddhuraju P., Pugalenti M. y Janardhanan K. "Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna sinensis*". Food Chemistry 63(2):259-264 (1998).
 - ♦ Viljanen K., Sundberg S., Ohshima T. y Heinonen M. "Carotenoids as antioxidant to prevent photooxidation". Eur. J. Lipid Sci. Technol., 104:353-359 (2002)
 - ♦ Walter-López H., Leenhardt F., Coudray C. y Remesy C. "Minerals and phytic acid interactions: it is a real problem for human nutrition?". International J. Food Sci. and Technol. 37:727-739 (2002).

- ♦ Walz O.P y Pallauf J. "Microbial phytase combined with amino acid supplementation reduces P and N excretion of growing and finishing pigs without loss of performance". International Journal of Food Science and Technology, 37:835-848 (2002).
- ♦ Wang N., Daun J.K. y Malcolmson L.J. "Relationship between physicochemical and cooking properties, and effects of cooking on antinutrients, of yellow field peas (*Pisum sativum*)". J. Sci. Food Agric. 83:1228-1237 (2003).
- ♦ Wang H.L. y Hesseltine C.W. "Use of microbial cultures: legume and cereal products". Food Technology, January:79-83 (1981).
- ♦ Wang C-F, Tsay S-M., Lee C.Y., Liu S-M. y Aras N.K. "Phytate content of taiwanese diet determined by ^{31}P Fourier transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy". J. Agric. Food Chem., 40:1030-1033 (1992).
- ♦ Wong-Leung Y.L., Fong W.F. y Lam W.L. "Production of α -galactoidase by *Monascus* grown on soybean and sugarcane wastes". World Journal of Microbiology and Biotechnology 9, 529-533 (1995).
- ♦ Wyatt C.J., Pérez Carballido S. y Méndez R.O. " α - and γ -tocopherol content of selected foods in the mexican diet: Effect of cooking losses". Journal Agriculture and Food Chemistry, 46:4657-4661 (1998).
- ♦ Yokota T., Hattori T., Ohishi H., Hasegawa K. y Watanabe K. "The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits". Lebensm. Wiss. u.- Technol., 29, 751-755 (1996).

- ♦ Zamora A.F. y Fields M.L. "Nutritive quality of fermented *coupeas* (*Vigna sinensis*) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.)". *Journal Food Science* 44:243-236 (1979).
- ♦ Zhou J.R. y Erdman J.W. "Phytic acid in health and disease". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35(6):495-508 (1995).
- ♦ Zhou J.R., Fordyce E.J., Raboy V., Dickinson D.B., Wong M.S., Burns R.A. y Erdman J.W. "Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats". *Journal of Nutrition*, 122:2466-2473 (1992).
- ♦ Zielinski H. "Peroxyl radical-trapping capacity of germinated legume seeds". *Nahrung/Food*, 46, 2, 100-104 (2002).
- ♦ Zielinski H., Honke J., Troszynska A. y Kozłowska H. "Reduced-Oxidized Glutathione Status as a Potential Index of Oxidative Stress in Mature Cereal Grain". *Cereal Chemistry*, 76, 6, 944-948 (1999).
- ♦ Zielinski H. y Kozłowska H. "Superoxide scavenging activity of cereal grains before and after hyfrothermal processing". *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 9/50, 3S, 85-90 (2000).
- ♦ Zielinski H., Mudway I., Kozłowska H. y Kelly F.J. "Impact of germination on glutathione content in cruciferous seeds". *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 11/52, SI 1, 68-72 (2002).
- ♦ Zulet M.A. y Martínez J.A. "Dieta mediterránea": Legumbres y colesteroemia, *Rev. Chil. Nutr.*, 28 (2), (2001)
- ♦ Zyta K. "Mould phytases and their application in the food industry". *World Journal Microbiology and Biotechnology* 8:467-472 (1992).

- ♦ Zyta K., Koreleski J. y Kujawski M. "Dephosphorylation of phytate compounds by means of acid phosphatase from *Aspergillus niger*". J. Sci. Food Agric. 49:315-324 (1989).

